

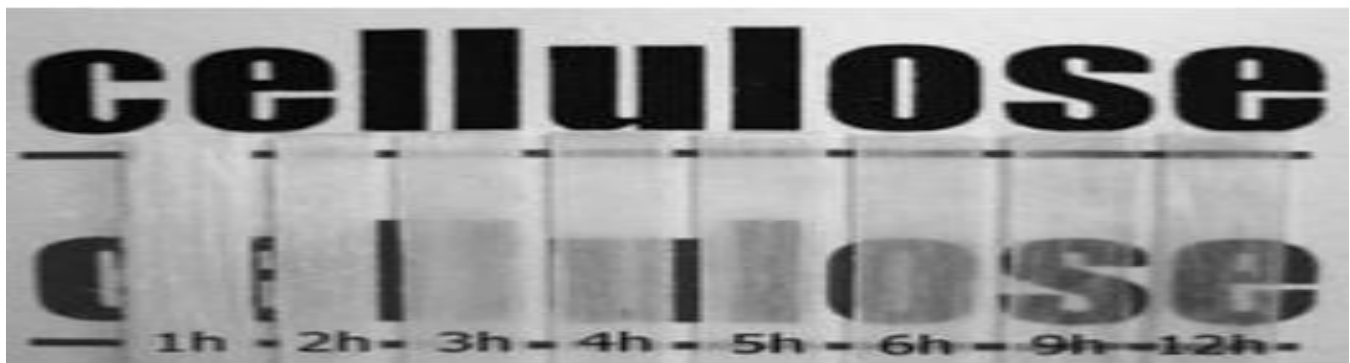


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**«Μελέτη της παραγωγής βακτηριακής  
κυτταρίνης υπό διαφορετικές συνθήκες  
μικροβιακής ζύμωσης»**



**ΠΜΣ:** Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:** Βιοδιεργασίες Τροφίμων και Βιοδιυλιστήρια

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:** Κουτίνας Απόστολος

Παρθενίου Π. Χρυσούλα

Αθήνα, 2015

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη της παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης υπό διαφορετικές συνθήκες μικτροβιακής ζύμωσης»

**Επιβλέπων Καθηγητής:** Απόστολος Κουτίνας

**Εξεταστική Επιτροπή:** Απόστολος Κουτίνας, Σεραφείμ Παπανικολάου, Παναγιώτης Σκανδάμης

Παρθενίου Π. Χρυσούλα

# Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια «Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Π.Μ.Σ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου». Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Κουτίνα Αποστόλη (επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας μελέτης), τον Παπανικολάου Σεραφείμ και Σκανδάμη Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου και την ανάθεση αυτού του τόσο ενδιαφέροντος θέματος για την μεταπτυχιακή μου μελέτη. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες Λαδάκη Δημήτρη και Τσούκο Ερμίντα για την πολύτιμη βοήθειά τους καθ' όλη την διάρκεια την πορείας μου. Ευχαριστώ την κυρία Καλατζή Ουρανία για την βοήθειά της στο ξεκίνημα της παρούσας μελέτης. Τέλος επιθυμώ να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την κατανόηση και την συμπαράστασή τους κατά την διάρκεια διεξαγωγής αυτής της μελέτης.

## Περίληψη

Η κυτταρίνη αποτελεί βασικό συστατικό της φυτικής βιομάζας (PC) καθώς και έναν εκπρόσωπο των μικροβιακών εξωκυτταρικών πολυμερών (BC). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο εμπορικά σάκχαρα όπως η γλυκόζη και συνδυασμός των γλυκόζη-σακχαρόζη-φρουκτόζη, καθώς επίσης και διάφορα παραπροϊόντα ή υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση του pH, του ρυθμού ανάδευσης, του λόγου επιφάνειας προς τον όγκο και τέλος του εμβολίου στην παραγωγικότητα της βακτηριακής κυτταρίνης.

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου διεξήχθησαν με χρήση του βακτηριακού στελέχους *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973. Η βάση όλων των βακτηριακών ζυμώσεων που διήρκησαν 10 ημέρες ήταν το μέσο καλλιέργειας Hestrin-Schramm. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του pH στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Η βακτηριακή κυτταρίνη παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (4 g/L) όταν το pH του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας ρυθμιζόταν στην τιμή 6, σε σχέση με τις ζυμώσεις όπου δεν υπήρχε ρύθμιση του pH (2,97 g/L). Σε επόμενη σειρά πειραμάτων εξετάστηκαν τρεις διαφορετικοί ρυθμοί ανάδευσης, ήτοι 180 rpm, 100 rpm και 40 rpm, και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις βακτηριακής κυτταρίνης που προέκυψαν ήταν 2 g/L, 2,6 g/L και 4 g/L. Ακολούθησαν ζυμώσεις κατά τις οποίες αξιολογήθηκε η επίδραση της επιφάνειας του θρεπτικού μέσου στην οποία βιοσυντίθεται το πολυμερές. Για τον λόγο αυτό, μελετήθηκαν διαφορετικοί λόγοι επιφάνειας προς τον όγκο που καταλαμβάνει το θρεπτικό μέσο. Η μεγαλύτερη παραγωγή (1,88 g/L) εμφανίστηκε σε λόγο επιφάνειας προς όγκο  $\lambda=0,5 \text{ cm}^{-1}$ , ενώ η μικρότερη (1,04 g/L) σε λόγο  $\lambda=0,068 \text{ cm}^{-1}$ . Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία διέφεραν ως προς την ποσότητα του εμβολίου. Τα εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την μορφή μεμβρανών. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης επιτεύχθηκε με την μικρότερη ποσότητα εμβολίου (1,4 g/L).

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ζύμωση χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα συνδυασμό των σακχάρων γλυκόζη (67 %), σακχαρόζη (7 %) και φρουκτόζη (26 %), με σκοπό να πραγματοποιηθεί προσομοίωση της σύστασης του χυμού του πορτοκαλιού. Ως βάση σύγκρισης και σε αυτή την ζύμωση ήταν το θρεπτικό μέσο Hestrin- Schramm και η τελική συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 8,4 g/L.

Τέλος, εξετάστηκε η προοπτική αξιοποίησης στερεών αμυλοπρωτεϊνούχων αποβλήτων της βιομηχανίας παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής ως ένα πλήρες θρεπτικό μέσο για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Για την υδρόλυση του αμύλου και των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα που παρήχθησαν μέσω της ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori*. Η τελική συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης που επιτεύχθηκε ήταν 4,6 g/L. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε χυμό από πορτοκάλι όπου η τελική συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 13,4 g/L.

# Abstract

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth, recognized as the major component of plant biomass, but also a representative member of extracellular polysaccharides produced via microbial fermentation. In the present study, the production of bacterial cellulose was investigated in different fermentation conditions using commercial sugars, such as glucose, and various combinations of glucose-sucrose-fructose, as well as various wastes and by-product streams derived by the food industry as a sole source of nutrients. Specifically, it was evaluated the influence of pH, agitation rate, surface to volume ratio and finally the effect of inoculum in the production of bacterial cellulose.

Batch fermentations were carried out with the bacterial strain *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973. The basis of all bacterial fermentations, which lasted 10 days, was the Hestrin-Schramm medium. Initially, the effect of the pH value in the production of bacterial cellulose was investigated. Bacterial cellulose reached the highest concentration (4 g/L) when the pH of the culture medium was adjusted to the optimum value (pH 6), while lower concentration was produced when no pH adjustment was employed (2.97 g/L). In the next set of experiments, three different agitation rates of 180 rpm, 100 rpm and 40 rpm were evaluated leading to bacterial cellulose concentrations of 2 g/L, 2.6 g/L and 4 g/L, respectively. Subsequent fermentations evaluated the effect of the ratio of surface to volume of the fermentation medium used. The highest production of bacterial cellulose (1.87 g/L) was achieved at a ratio  $\lambda = 0.5 \text{ cm}^{-1}$ , while the lowest concentration of bacterial cellulose (1.04 g/L) was achieved at a ratio of  $\lambda = 0.068 \text{ cm}^{-1}$ . Furthermore, several experiments were performed with varying inoculums addition in the form of bacterial cellulose membranes. Three series of experiments were carried out with one, two and three additions of equal quantity of bacterial cellulose membranes. The highest concentration of bacterial cellulose (1.4 g/L) was obtained when the lowest quantity of inoculum was employed.

A fermentation with a combination of sugars in the range of glucose (67 %), sucrose (7 %) and fructose (26 %) as carbon source was studied in order to simulate the utilization of orange juice as fermentation medium. The basis of this bacterial

fermentation was the Hestrin- Schramm medium and the final concentration of the bacterial cellulose was 8.4 g/L.

Finally, the perspective of utilizing renewable raw materials and by-product streams produced by the food industry as sole fermentation media for the production of bacterial cellulose was evaluated. More particularly, starch-based solid wastes generated by a confectionery industry were used as carbon and nutrient sources for the production of bacterial cellulose. These waste streams were enzymatically hydrolysed into fermentation media using crude enzymes produced via solid state fermentation using the fungal strain *Aspergillus awamori*. The final concentration of the bacterial cellulose obtained was 4.6 g/L. Bacterial fermentations were also conducted using orange juice as a nutrient medium. The concentration of the bacterial cellulose achieved was 13.4 g/L.

# Περιεχόμενα

<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>12</b>
1.1 Η Δομή της Βακτηριακής Κυτταρίνης .....	13
1.2 Ιδιότητες βακτηριακής κυτταρίνης .....	16
Πίνακας 1.1 Φυσικές-μηχανικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης. ....	17
1.3 Λόγοι παραγωγής της μεμβράνης κυτταρίνης .....	18
1.4 Εφαρμογές βακτηριακής κυτταρίνης .....	18
1.5 Μικροοργανισμοί που παράγουν βακτηριακή κυτταρίνη.....	20
Πίνακας 1.2 Διαφορετικά βακτηριακά στελέχη που παράγουν κυτταρίνη (Chawla et al. 2009).....	200
Πίνακας 1.3: Δομή βακτηριακής κυτταρίνης ανάλογα με τον μικροοργανισμό. .....	211
1.6 Βιοσύνθεση βακτηριακής κυτταρίνης.....	233
1.7 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης μέσω ζύμωσης.....	266
Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	30
<b>2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>32</b>
2.1 Ζύμωση Στερεής Κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF).....	332
2.1.1 Βιολογικό Υλικό .....	332
2.1.2 Εμβόλιο για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης με τους <i>Aspergillus awamori</i> .....	32
2.1.3 Ζύμωση Στερεής Κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus awamori</i> .....	33
2.2 Υδρόλυση αμυλούχων υποστρωμάτων προς παραγωγή θρεπτικού μέσου πλούσιο σε γλυκόζη και άζωτο.....	34
2.3 Προετοιμασία των υδρολυμάτων για την χρήση τους σε πειράματα ζυμώσεων προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης .....	34
2.4 Υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου (batch) προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	35
2.4.1 Βιολογικό υλικό .....	35
2.4.2 Θρεπτικά υποστρώματα.....	36
2.4.3 Συνθήκες ανάπτυξης.....	36
2.4.4 Παραλαβή και καθαρισμός της βακτηριακής κυτταρίνης.....	37



2.5 Χημικές αναλύσεις.....	37
2.5.1 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN Analysis) ....	37
2.5.2 Μέθοδος χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	39
<b>3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>40</b>
3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης του pH ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	40
Διάγραμμα 3.1 Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια της ελεγχόμενης ως προς το pH ζύμωσης. ....	41
Διάγραμμα 3.2 Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια ζύμωσης χωρίς παρέμβαση στο pH. ....	41
Διάγραμμα 3.3 Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζυμώσεων με ή χωρίς ρύθμιση του pH του θρεπτικού μέσου.....	442
Διάγραμμα 3.4 Επί τοις εκατό ποσοστό κατανάλωσης γλυκόζης μετά από 10 μέρες ζύμωσης.....	42
3.2 Αξιολόγηση της επίδρασης του ρυθμού ανάδευσης ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης .....	43
Διάγραμμα 3.5 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης μετά από 10 μέρες ζύμωσης σε 3 διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης 40, 100 και 180 rpm.....	44
Διάγραμμα 3.6 Επί τοις εκατό ποσοστό κατανάλωσης γλυκόζης μετά από 10 μέρες ζύμωσης σε 3 διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης 40, 100 και 180 rpm.....	44
Διάγραμμα 3.7 Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζυμώσεων σε 3 διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης 40, 100 και 180 rpm. ....	45
3.3 Αξιολόγηση της επίδρασης του λόγου επιφάνεια προς όγκο κατά την παραγωγήβακτηριακήςκυτταρίνης.....	45
Διάγραμμα 3.8 Κατανάλωση γλυκόζης σε ζυμώσεις διάρκειας 14 ημερών με διαφορετικό λόγο επιφάνειας/όγκου ( $\lambda$ ): 0,068; 0,09; 0,16; 0,5; 0,71; 1; 1,2 $\text{cm}^{-1}$ .....	46
Διάγραμμα 3.9 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε ζυμώσεις διάρκειας 14 ημερών με διαφορετικό λόγο επιφάνειας/όγκου ( $\lambda$ ): 0,068; 0,09; 0,16; 0,5; 0,71; 1; 1,2 $\text{cm}^{-1}$ .....	47

Διάγραμμα 3.10 Συντελεστής απόδοσης προϊόντος σε ζυμώσεις με διαφορετικό λόγο επιφάνειας/όγκου ( $\lambda$ ) διάρκειας 14 ημερών.....	47
3.4 Αξιολόγηση της ποσότητας του εμβολίου ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.....	49
Διάγραμμα 3.11 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια ζυμώσεων με διαφορετική ποσότητα εμβολίου.....	50
Διάγραμμα 3.12 Συντελεστής απόδοσης βακτηριακής κυτταρίνης σε ζυμώσεις με διαφορετική ποσότητα εμβολίου. ....	50
Διάγραμμα 3.13 % Κατανάλωση γλυκόζης σε ζυμώσεις που χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα εμβολίου. ....	51
Διάγραμμα 3.14 Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζυμώσεων που χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα εμβολίου. ....	51
3.5 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-φρουκτόζης-σακχαρόζης.....	552
Πίνακας 3.1 Συγκέντρωση των σακχάρων του υποστρώματος. ....	552
Διάγραμμα 3.15 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και κατανάλωση υποστρώματος σε ζύμωση με θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-σακχαρόζης-φρουκτόζης.....	52
Διάγραμμα 3.16 Κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινοομάδων κατά την διάρκεια ζύμωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-σακχαρόζης-φρουκτόζης. ....	53
3.6 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ανανεώσιμες πρώτες ύλες .....	53
3.6.1 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από αμυλούχο υδρόλυμα προερχόμενο από στερεά απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων .....	53
Διάγραμμα 3.17 Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο προέρχεται από υδρολυμένα στερεά απόβλητα. ....	54
Διάγραμμα 3.18 Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο προέρχεται από υδρολυμένα στερεά απόβλητα.....	54
3.6.2 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από χυμό πορτοκαλιού .....	55
Πίνακας 3.2 Ποσοτικοποίηση των σακχάρων του χυμού πορτοκαλιού.....	55

Διάγραμμα 3.19 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και κατανάλωση των ολικών σακχάρων κατά την διάρκεια ζύμωσης με θρεπτικό μέσο χυμό πορτοκαλιού.....	56
Διάγραμμα 3.20 Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζύμωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα από χυμό πορτοκαλιού. ....	56
<b>4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>57</b>
<b>5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>59</b>

# 1. Εισαγωγή

Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο βιοπολυμέρες που βρίσκεται στην γη. Αποτελεί βασικό συστατικό της φυτικής βιομάζας (PC) καθώς και έναν εκπρόσωπο των μικροβιακών εξωκυτταρικών πολυμερών (BC). Η βακτηριακή κυτταρίνη ανήκει στην κατηγορία των προϊόντων του πρωτογενούς μεταβολισμού και λειτουργεί ως μια προστατευτική μεμβράνη, ενώ η φυτική κυτταρίνη έχει δομικό ρόλο.

Οι δύο τύποι κυτταρινών διαφορετικής προέλευσης αν και έχουν τον ίδιο μοριακό τύπο,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , διαφέρουν ως προς τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες. Η βακτηριακή κυτταρίνη προτιμάται της φυτικής λόγω του υψηλότερου βαθμού πολυμερισμού, της υψηλότερης αντοχής σε δυνάμεις εφελκυσμού και της μεγαλύτερης ικανότητας συγκράτησης νερού έχοντας ήδη πολλές εφαρμογές σε διάφορους τομείς. Τα ινίδια της βακτηριακής κυτταρίνης είναι περίπου 100 φορές λεπτότερα από εκείνα της PC καθιστώντας το ένα εξαιρετικά πορώδες υλικό, το οποίο επιτρέπει την μεταφορά αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων εντός του τραύματος λειτουργώντας παράλληλα και ως εμπόδιο σε εξωτερικές μολύνσεις.

Η πιο γνωστή εφαρμογή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι η χρήση της ως πρώτη ύλη για την παραγωγή του nata de coco, ενός γηγενούς επιδορπίου που παράγεται στις Φιλιππίνες. Για την παραγωγή του φύλλα από τζελ κυτταρίνης πάχους 1 cm τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση με νερό καρύδας κόβονται σε κύβους και βυθίζονται σε ζάχαρη. Το nata de coco παρασκευάζεται και στην Ινδονησία σε μεγάλες ποσότητες.

Παρά το γεγονός ότι η σύνθεση ενός εξωκυτταρικού ζελατινώδους στρώματος από το *Acetobacter xylinum* αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1886 από τον A. J. Brown, η βακτηριακή κυτταρίνη μελετήθηκε κυρίως κατά το δεύτερο μισό του 20ου αιώνα. Εντατικές μελέτες επί της σύνθεσης της BC, χρησιμοποιώντας το στέλεχος *A. xylinum*, ξεκίνησαν από τους Hestrin et al. (1954), οι οποίοι απέδειξαν ότι σε στατικές συνθήκες ο μικροοργανισμός συνθέτει κυτταρίνη παρουσία γλυκόζης και οξυγόνου. Στη συνέχεια, ο Colvin (1957) ανέχνευσε σύνθεση κυτταρίνης σε δείγματα που περιείχαν εκχύλισμα ελεύθερων κυττάρων του *A. xylinum*, γλυκόζη και ATP.

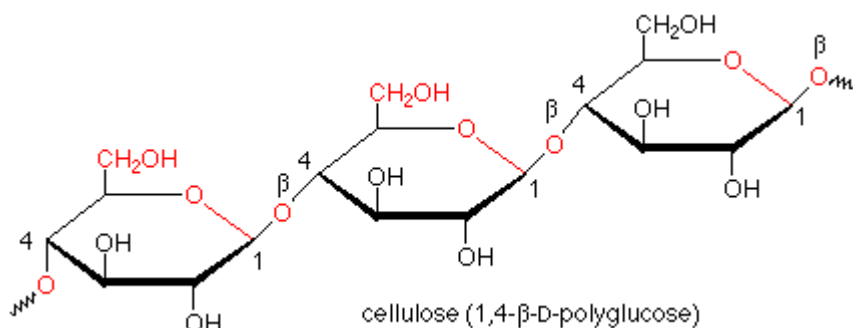
Τα πιο αποδοτικά μικροβιακά στελέχη για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια που παράγουν οξικό οξύ, όπως το *Acetobacter xylinum*. Τα βακτήρια αυτά έχουν καθιερωθεί ως μικροοργανισμοί

πρότυπα για την παραγωγή αυτού του βιοπολυμερούς καθώς μπορούν να παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις βακτηριακή κυτταρίνης από ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα και αζώτου. Η παραγόμενη κυτταρίνη είναι υψηλότερης καθαρότητας σε σύγκριση με την φυτική, η οποία συνδέεται με ημικυτταρίνες και λιγνίνη.

Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων, που προκύπτουν από την υπέρλεπτη δικτυωμένη δομή της, η βακτηριακή κυτταρίνη έχει βρει ένα πλήθος εφαρμογών όπως στην βιομηχανία χάρτου, στην κλωστοϋφαντουργία, στις βιομηχανίες τροφίμων καθώς και ως βιοϋλικό σε καλλυντικά και σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές. Οι βιομηχανικές εφαρμογές αυτού του πολυσακχαρίτη εξαρτώνται από την κλίμακα της παραγωγής καθώς και το κόστος παραγωγής του πολυμερούς. Ως εκ τούτου, οι ερευνητικές μελέτες έχουν ως στόχο στην παραγωγή οικονομικά βιώσιμων τεχνολογιών παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης.

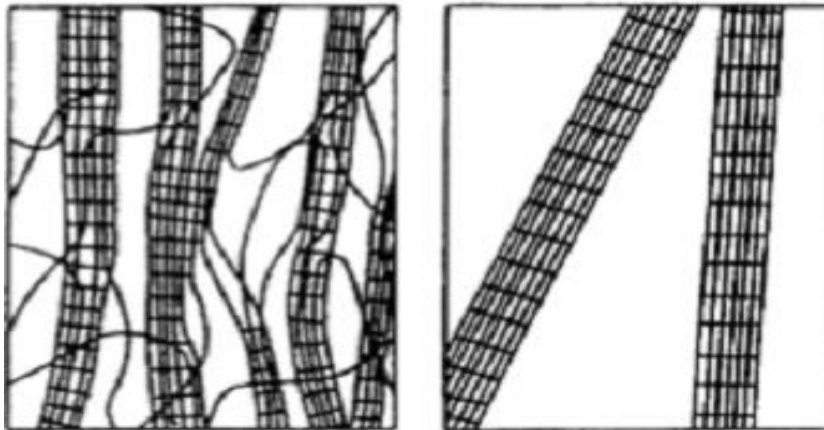
## 1.1 Η Δομή της Βακτηριακής Κυτταρίνης

Η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές, αποτελούμενο από μόρια D-γλυκόζης συνδεδεμένα με  $\beta(1\rightarrow4)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς. Εκτεταμένη έρευνα έδειξε ότι η βακτηριακή κυτταρίνη είναι χημικά ίδια με την κυτταρίνη που απομονώνεται από τα φυτά, όμως, η μακρομοριακή δομή της καθώς και οι ιδιότητές της διαφέρουν. Αλυσίδες βακτηριακής κυτταρίνης σχηματίζουν υποϊνίδια, πλάτους 1,5 nm. Αυτά τα υποϊνίδια κρυσταλλώνονται σε μικροϊνίδια (Jonas and Farah, 1998) και αυτά με την σειρά τους σε δέσμες και τελικά σε κορδέλες (Yamanaka et al., 2000).

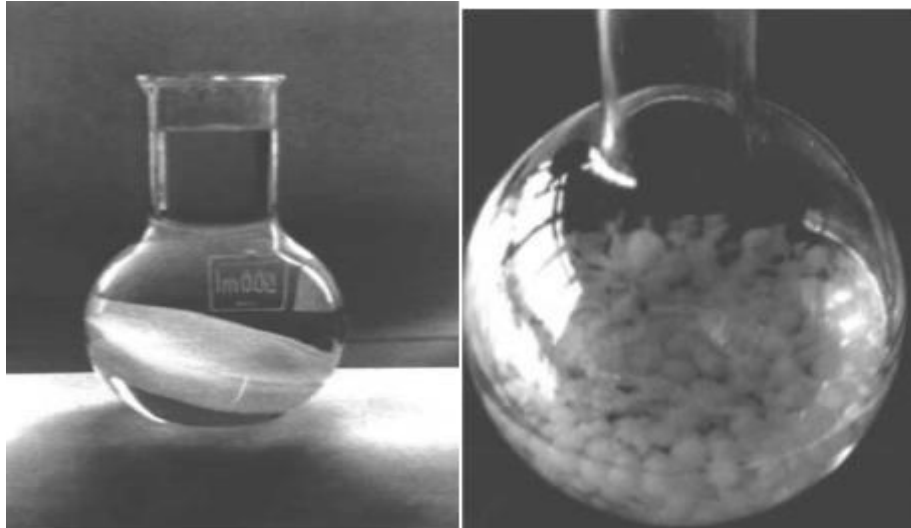


**Εικόνα 1.1** Επαναλαμβανόμενη μονάδα κυτταρίνης.

Η μακροσκοπική μορφολογία της βακτηριακής κυτταρίνης εξαρτάται από τις συνθήκες της καλλιέργειας (Watanabe et al., 1998a, Yamanaka et al., 2000). Σε στατικές συνθήκες, τα βακτήρια συσσωρεύονται στην κυτταρινούχο μεμβράνη που σχηματίζεται στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου μέσω μικροϊνιδίων τα οποία σχηματίζουν παράλληλα άλλα αποδιοργανωμένα επίπεδα (Jonas and Farah, 1998). Οι κλώνοι της βακτηριακής κυτταρίνης η οποία παράγεται υπό στατικές συνθήκες (S-BC) διασυνδέονται λιγότερο συχνά από αυτούς της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγεται σε συνθήκες ανάδευσης (A-BC) κάτω από τις οποίες σχηματίζουν ακανόνιστους κόκκους καλά διεσπαρμένους στο μέσο καλλιέργειας (Vandamme et al., 1998). Οι κλώνοι της A-BC διασυνδέονται σχηματίζοντας μια πυκνή πλεγματική δομή και έχουν σχεδόν παράλληλες και κάθετες κατευθύνσεις (Watanabe et al., 1998a).



**Εικόνα 1.2** Σχηματικό μοντέλο των μικροϊνιδίων BC (δεξιά) σε σύγκριση με τα ινίδια PC (Iguchi et al., 2000).



**Εικόνα 1.3** Σφαιρίδια BC σε ζυμώσεις υπό ανάδευση (δεξιά), μεμβράνη BC σε στατικές συνθήκες καλλιέργειας (αριστερά).

Οι διαφορές στην τρισδιάστατη δομή μεταξύ της S-BC και A-BC ανιχνεύθηκαν κατά την σάρωσή τους σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM). Τα ινίδια της πρώτης είναι πιο εκτεταμένα και συσσωρευμένα το ένα πάνω από το άλλο κατά τρόπο διασταυρούμενο, ενώ οι άξονες ινιδίων της A-BC είναι μπλεγμένοι μεταξύ τους και κυρτοί (Johnson and Neogi, 1989). Επιπλέον, τα ινίδια της A-BC έχουν μεγαλύτερο πλάτος διατομής (0,1-0,2  $\mu\text{m}$ ) από αυτά της S-BC (0.05-0.10  $\mu\text{m}$ ).

Οι δύο κρυσταλλικές μορφές της κυτταρίνης, που ορίζονται ως I και II μπορούν να διακριθούν με ακτίνες X, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία Raman και υπέρυθρη ανάλυση (Johnson and Neogi, 1989). Η κυτταρίνη I, η οποία συντίθεται από την πλειοψηφία των φυτών καθώς επίσης και από το βακτήριο *A. xylinum* σε στατικές συνθήκες, αποτελείται από  $\beta(1\rightarrow4)$  αλυσίδες γλυκάνης διατεταγμένες παράλληλα και ομοαξονικά σε αντίθεση με αυτές της κυτταρίνης II που είναι διατεταγμένες αντιπαράλληλα και κατά τυχαίο τρόπο. Οι τελευταίες συνδέονται με μεγαλύτερο αριθμό δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα να είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερές. Η A-BC έχει μικρότερο δείκτη κρυσταλλικότητας και βαθμό κρυστάλλωσης από την S-BC (Watanabe et al., 1998). Συντίθεται σε αναδεδόμενες συνθήκες καλλιέργειας, ενώ παράγεται κυρίως από ορισμένα φύκη, μύκητες και βακτήρια, όπως *Sarcina ventriculi* (Jonas and Farah, 1998). Βιομηχανικά παράγεται με χημική μετατροπή της PC.

Με την χρήση CP/MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR είναι πιθανόν να ανιχνευτούν η κυτταρίνη I<sub>A</sub> και I<sub>B</sub>, δύο διακριτές μορφές της κυτταρίνης (Watanabe et al., 1998). Αυτές οι δύο μορφές απαντώνται σε φύκη, βακτήρια και στην κυτταρίνη των φυτών (PC). Το περιεχόμενο της PC σε I<sub>A</sub> κυτταρίνη είναι μικρότερο από αυτό της BC όπως επίσης και της A-BC συγκριτικά με αυτό της S-BC (Johnson and Neogi, 1989). Έχει αναφερθεί ότι η διαφορά στο κλάσμα μάζας της I<sub>A</sub> κυτταρίνης είναι στενά συνδεδεμένη με το μέγεθος των κρυσταλλιτών.

Άλλα πιθανά αλλόμορφα της κυτταρίνης είναι τα III και IV. Η κυτταρίνη III μπορεί να σχηματιστεί μετά από επεξεργασία με υγρή αμμωνία της κυτταρίνης I ή II, ενώ η κυτταρίνη IV σχηματίζεται με θέρμανση της κυτταρίνης III σε γλυκερόλη (Huber et al., 2011).

## 1.2 Ιδιότητες βακτηριακής κυτταρίνης

Οι δομές της βακτηριακής κυτταρίνης σχηματίζονται από εξωκυτταρικές νανο-ίνες παραγόμενες από πολλά βακτήρια. Αυτές οι νανο-ίνες έχουν διάμετρο 100 nm και σχηματίζουν ένα συνεκτικό τρισδιάστατο δίκτυο. Μακροσκοπικά, αυτό το δίκτυο της βακτηριακής κυτταρίνης κατασκευάζεται σαν ένας υμένας που παίρνει την μορφή του σκεύους όπου αναπτύσσονται τα βακτήρια (Klemm et al., 2001).

Οι δομές της βακτηριακής κυτταρίνης μοιάζουν με κορδέλες που έχουν διάμετρο 100 nm και μήκος 100 μm. Αυτές οι κορδέλες σχηματίζονται από δέσμες μικροϊνών διαμέτρου 2-4 nm (Iguchi et al., 2000). Στην φυσική της κατάσταση, η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα υδατοδιαλυμένο δίκτυο ινιδίων κυτταρίνης. Οι Grande et al. (2008) χρησιμοποίησαν αυτές τις εικόνες για να μετρήσουν τις μορφολογικές ιδιότητες της ξηρής βακτηριακής κυτταρίνης. Το μέσο μέγεθος (απόσταση μεταξύ των σημείων διασταύρωσης) είναι  $0,523 \pm 0,273$  nm ενώ ο προσανατολισμός (η μέση γωνία που σχηματίζεται από τα τμήματα) των νανο-ινών είναι  $85,64 \pm 0,56^\circ$ .

Οι μηχανικές ιδιότητες των δομών εξαρτώνται στενά από τις ιδιότητες του δικτύου. Οι Grande et al (2008) έχουν αναφέρει τιμή αντοχής σε εκφυλισμό  $241,42 \pm 21,86$  MPa, μέγιστη επιμήκυνση  $8,21 \pm 3,01\%$  και μέτρο ελαστικότητας του Young  $6.86 \pm 0.32$  GPa. Αυτές οι αξιοσημείωτες μηχανικές ιδιότητες οφείλονται στην ενιαία δομή και στον υψηλό προσανατολισμό του δικτύου των πολύ λεπτών ινών



όπως και στην υψηλή χημική σταθερότητα της βακτηριακής κυτταρίνης. Παρ' όλα αυτά μια μελέτη των McKenna et al. (2009) έδειξε μια μείωση της μηχανικής αντοχής με την αύξηση του χρόνου ζύμωσης.

Στον πίνακα 1.1 παρατίθενται μερικές από τις βασικές φυσικές και χημικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης σύμφωνα με διάφορες μελέτες.

**Πίνακας 1.1** Φυσικές-μηχανικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης.

Δείκτης κρυσταλλικότητας	60-90 %
Βαθμός πολυμερισμού	2000-6000 (Jonas and Fanah, 1998) 16000-20000 (Watanabe et al., 1998b), (Klemm et al., 2011)
Μέτρο ελαστικότητας	16-18 GPa (M. Iguchi et al.,2000) 15-35 GPa (Klemm et al., 2005)
Αντοχή σε εφελκυσμό	256 MPa (M. Iguchi et al.,2000) 200-300 MPa (Klemm et al., 2005)
Επιμήκυνση	1,7 % (M. Iguchi et al.,2000) 1,5-2 % (Klemm et al., 2005)
Ικανότητα συγκράτησης νερού	>95 %
Βιοποικοδομησιμότητα	100 %

Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι ενώ μερικοί συγγραφείς αναφέρουν ότι η δομή της κυτταρίνης δεν επηρεάζεται αλλάζοντας την πηγή άνθρακα ή αζώτου υπάρχουν αναφορές που έχουν παρατηρήσει διαφορές. Επίσης, μετά από σύγκριση της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγεται κάτω από στατικές συνθήκες και εκείνης που παράγεται υπό αναδεδυόμενες, η δεύτερη οδήγησε σε απώλεια της μηχανικής αντοχής, χαμηλότερο βαθμό πολυμερισμού, δείκτη κρυσταλλικότητας, ποσοστό της κυτταρίνης I, μέτρο ελαστικότητας Young, αλλά υψηλότερη ικανότητα συγκράτησης νερού και υψηλότερο ιξώδες (Ruka et al., 2012).

### 1.3 Λόγοι παραγωγής της μεμβράνης κυτταρίνης

Η μήτρα του πολυμερούς στην οποία παγιδεύονται τα βακτηριακά στελέχη διευκολύνει την προσκόλλησή τους επάνω σε οποιαδήποτε προσβάσιμη επιφάνεια και την παροχή θρεπτικών συστατικών, καθώς η συγκέντρωσή τους στο πλέγμα του πολυμερούς είναι αισθητά αυξημένη λόγω των προσροφητικών ιδιοτήτων του, σε σύγκριση με το γύρω υδατικό περιβάλλον (Jonas και Farah, 1998; Costeron, 1999).

Σε άλλες μελέτες αναφέρεται ότι η κυτταρίνη λειτουργεί ως αποταμιευτικό συστατικό το οποίο καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς όταν έχουν καταναλωθεί τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος. Συνεπώς η αποσύνθεσή της κυτταρίνης καταλύεται από έξω- και ενδογλυκάνες, η παρουσία των οποίων ανιχνεύτηκε στο μέσο καλλιέργειας κάποιων κυτταρινοπαραγωγών στελεχών *A. xylinum*.

Εξαιτίας του υδρόφιλου χαρακτήρα της μεμβράνης, αυξάνεται η αντίσταση των βακτηριακών κυττάρων έναντι δυσμενών μεταβολών (μείωση νερού, εμφάνιση τοξικών ουσιών και παθογόνων οργανισμών) και συνεπώς εξασφαλίζεται η επιβίωσή τους στο εσωτερικό της μεμβράνης. Διαπιστώθηκε, τέλος, ότι η μεμβράνη προστατεύει τους μικροοργανισμούς από την υπεριώδη ακτινοβολία.

### 1.4 Εφαρμογές βακτηριακής κυτταρίνης

Οι μοναδικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης, όπως η υψηλή καθαρότητα, ο υψηλός βαθμός κρυστάλλικότητας, η υψηλή πυκνότητα, ο υψηλός βαθμός συγκράτησης νερού κάνουν δυνατή την χρησιμοποίησή της σε πολλούς βιομηχανικούς τομείς όπως: στην βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας, χάρτου, τροφίμων, φαρμάκων, όπως και στην επεξεργασία αποβλήτων. Οι εφαρμογές της βακτηριακής κυτταρίνης συνοψίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

#### **Τρόφιμα:**

Η πρώτη εφαρμογή της βακτηριακής κυτταρίνης στην βιομηχανία τροφίμων ήταν για την παραγωγή του nata de coco, ενός επιδορπίου που παρασκευάζεται στις Φιλιππίνες. Το 1992, στην Ιαπωνία, βακτηριακή κυτταρίνη προστέθηκε στο kombucha, ένα ποτό διαίτης που έχει ως βάση του το τσάι. Βακτηριακή κυτταρίνη

έχει χρησιμοποιηθεί στα τρόφιμα ως παράγοντας σταθεροποίησης και ως πηκτικό μέσο για την διατήρηση του ιξώδους των τροφίμων. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε φυτικές ίνες καθώς και της υφής της έχει χρησιμοποιηθεί στα τρόφιμα ως ρυθμιστής υφής και παράγοντας μείωσης θερμίδων. Τέλος, εξαιτίας της βιοαποικοδομησιμότητά της πέρα των άλλων ιδιοτήτων της γίνονται μελέτες για την χρήση της ως συσκευασία στην Βιομηχανία Τροφίμων.

### **Φάρμακα και Ιατρική:**

Σύμφωνα με την σύγχρονη προσέγγιση για την θεραπεία των πληγών ένας ιδανικός επίδεσμος θα πρέπει να περιέχει υλικά τα οποία θα αποτελούν εμπόδιο στην δημιουργία μολύνσεων, να ελέγχουν την απώλεια υγρών καθώς επίσης και να μειώνουν τον πόνο κατά την διάρκεια της θεραπείας διατηρώντας την υγρασία στην περιοχή της πληγής. Καθώς η βακτηριακή κυτταρίνη είναι ένα πορώδες υλικό, επιτρέπει την αποτελεσματική μεταφορά αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων στην πληγή, ενώ παράλληλα λειτουργεί ως ένα φυσικό εμπόδιο που εμποδίζει τις επιμολύνσεις. Επίσης, η υψηλή ικανότητά της στην συγκράτηση νερού την καθιστούν ιδανική για την χρήση της ως επίδεσμος. Έρευνες έδειξαν ότι ο χρόνος θεραπείας των πληγών με χρήση επιδέσμων που είχε ως βάση την βακτηριακή κυτταρίνη μειώθηκε συγκριτικά με την θεραπεία χωρίς την χρήση βακτηριακής κυτταρίνης (Portal et al., 2009). Η εταιρία Biofill από την Βραζιλία παρασκεύασε δύο εμπορικά προϊόντα κυτταρίνης, το Bioprocess και το Gengiflex (126) τα οποία έχουν εφαρμογή στην χειρουργική και στα οδοντικά εμφυτεύματα. Ένα άλλο εμπορικό προϊόν είναι το Prima Cell™ της εταιρίας Xylos Corp το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για την θεραπεία πληγών από φλεβικά έλκη. Μια επιπλέον παράμετρος που την κάνει σημαντική στις ιατρικές εφαρμογές (καρδιαγγειακό, ουροποιητικό, πεπτικό σύστημα) είναι ότι μπορεί εύκολα να μορφοποιηθεί σε διάφορα σχήματα διατηρώντας τις ιδιότητές της.

### **Άλλες εφαρμογές:**

Η βακτηριακή κυτταρίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως φίλτρο μεμβράνης σε ηχεία υψηλής πιστότητας και ακουστικά που διατίθενται στο εμπόριο από την Sony Corporation (Iguchi et al., 2000). Επίσης χρησιμοποιείται ως υλικό επίστρωσης χαρτιού και υλικό ενίσχυσης σε νανοσυνθετικά υλικά (Fernandes et al., 2009). Τέλος,

μελετώνται οι δυνατότητες χρήσης της κυτταρίνης ως πρόσθετο στην βιομηχανία καλλυντικών και ως πρώτη ύλη στην κλωστοϋφαντουργία.

## 1.5 Μικροοργανισμοί που παράγουν βακτηριακή κυτταρίνη

Η κυτταρίνη παράγεται από διάφορους μικροοργανισμούς όπως: μύκητες, βακτήρια και φύκη. Στα πράσινα φύκια, κυτταρίνη, ξυλάνη ή μαννάνη αποτελούν δομικούς πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων. Σε μικρότερο βαθμό, κυτταρίνη βρίσκεται σε όλα τα καφέ φύκια (*Phaeophyta*), στα κόκκινα φύκια (*Rhodophyta*) και στα περισσότερα από τα χρυσά φύκια (*Chrysophyta*) (Richmond et al., 1991). Επίσης, αναφέρθηκε η παρουσία της σε κάποιους μύκητες υπό την μορφή εσωτερικού κυτταρικού τοιχώματος αποτελούμενο από ομάδες D- γλυκάνης συνδεδεμένες με  $\beta(1\rightarrow3)$  και  $\beta(1\rightarrow6)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στους μύκητες *Oomycetes* η χυτίνη έχει αντικατασταθεί από κυτταρίνη, η οποία αντιπροσωπεύει το 15% της ξηρής μάζας του κυτταρικού τοιχώματος (Isizawa et al., 1976). Τα βακτήρια που παράγουν κυτταρίνη είναι στην πλειοψηφία τους Gram- αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη: *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* και *Alcaligenes* (Jonas and Farah, 1998). Κυτταρίνη παράγεται, επίσης, από το Gram-θετικό βακτήριο *Sarcina ventriculi*, αποτελώντας το 15% της συνολικής του μάζας. Οι πιο αποτελεσματικοί παραγωγοί της βακτηριακής κυτταρίνης είναι: *A. xylinum*, *A. hansenii* και *A. pasteurianus* (Chawla et al., 2009). Στον πίνακα 1.2 παρουσιάζονται διαφορετικά βακτηριακά στελέχη που παράγουν βακτηριακή κυτταρίνη.

**Πίνακας 1.2** Διαφορετικά βακτηριακά στελέχη που παράγουν κυτταρίνη (Chawla et al. 2009).

Μικροοργανισμός	Πηγή άνθρακα	Πρόσθετα	Χρόνος ζύμωσης	BC (g/L)
<i>A. xylinum</i> A. BRC 5	Γλυκόζη	Αιθανόλη, O <sub>2</sub>	52h	15,3
<i>G. hansenii</i> PJK (KCTC)	Γλυκόζη	O <sub>2</sub>	48h	1,72

10505 BP				
<i>G. hansenii</i> PJK (KCTC 10505 BP)	Γλυκόζη	Αιθανόλη	72h	2,50
<i>Acetobacter</i> sp. V6	Γλυκόζη	Αιθανόλη	8d	4,16
<i>Acetobacter</i> sp. A9	Γλυκόζη	Αιθανόλη	8d	15,20
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Μελάσα	-	72h	7,8
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Φρουκτόζη	Άγαρ, O <sub>2</sub>	72h	14,1
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Φρουκτόζη	Άγαρ	56h	12
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR2001	Φρουκτόζη	O <sub>2</sub>	52h	10,4
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR2001	Φρουκτόζη	Άγαρ, O <sub>2</sub>	44h	8,7
<i>Acetobacter xylinum</i> E25	Γλυκόζη	.	7d	3,5
<i>G. xylinus</i> strain (K3)	Μαννιτόλη	Πράσινο τσάι	7d	3,3
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	Γλυκόζη	Λιγνοσουλφονικά	7d	10
<i>Acetobacter xylinum</i> NUST4.1	Γλυκόζη	Αλγινικό νάτριο	5d	6
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> IFO 13773	Μελάσα	-	7d	5,76
<i>Gluconacetobacter</i> sp. RKY5	Γλυκερόλη	-	144h	5,63

Η δομή του πολυμερούς εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού, παρόλο που ο μηχανισμός σύνθεσής του είναι ίδιος για την πλειοψηφία των βακτηρίων που παράγουν βακτηριακή κυτταρίνη (Ross et al., 1991; Jonas and Farah, 1998). Στον πίνακα 1.3 παρατίθενται η δομή της βακτηριακής κυτταρίνης βάσει του μικροοργανισμού που την παράγει (Jonas and Farah, 1998).

**Πίνακας 1.3:** Δομή βακτηριακής κυτταρίνης ανάλογα με τον μικροοργανισμό.

Γένος	Δομή κυτταρίνης
<i>Acetobacter</i>	Εξωκυτταρικός υμένας αποτελούμενος από κορδέλες
<i>Achromobacter</i>	Ίνες
<i>Aerobacter</i>	Ίνες
<i>Agrobacterium</i>	Μικρές ίνες

<i>Alcaligenes</i>	Ίνες
<i>Pseudomonas</i>	Μη διακριτές ίνες
<i>Rhizobium</i>	Μικρές ίνες
<i>Sarcina</i>	Άμορφη κυτταρίνη
<i>Zoogloea</i>	Όχι καλά προσδιορισμένη

Το βακτήριο *A. xylinum*, εξαιτίας της ικανότητάς του να παράγει σε μεγάλη ποσότητα κυτταρίνη από ένα μεγάλο εύρος πηγών άνθρακα και αζώτου, αποτελεί τον μικροοργανισμό μοντέλο για τις μελέτες επί αυτού του πολυμερούς (Bielecki et al., 2005). Για τον λόγο αυτό, το βακτηριακό στέλεχος επαναταξινομήθηκε σαν ένα ξεχωριστό είδος και ονομάστηκε *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Cleenwerck et al. 2010). Αυτό το βακτήριο ήταν και το πρώτο που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης το 1886 από τον A. J. Brown. Είναι ένας υποχρεωτικά αερόβιος μικροοργανισμός και ανήκει στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Είναι βάκιλος που αποτελείται από μη κινητικά ραβδία μεγέθους 0,5 x 1,3 μm. Οι αποικίες του είναι λευκές, κρεμώδεις και λείες. Οξειδώνει το οξικό και το γαλακτικό άλας σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό και παράγει οξικό οξύ από αιθανόλη.

Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί η αναγκαιότητα εφαρμογής τεχνικών συντήρησης του μικροοργανισμού, οι οποίες να εξασφαλίζουν την επαναληψιμότητα της διεργασίας παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης και την μείωση του χρόνου προετοιμασίας. επίσης, θα πρέπει να παρέχουν υψηλά ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων, ενώ δεν θα πρέπει να επηρεάζουν τον σχηματισμό της κυτταρίνης. Πολλές τεχνικές έχουν ήδη μελετηθεί όπως η κατάψυξη σε εναιώρημα με την χρήση γλυκερόλης, διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), αποκορυφωμένου γάλακτος και ξήρανση σε σταγόνες ζελατίνης. Η χρήση της γλυκερόλης και του αποκορυφωμένου γάλακτος ως προστατευτικοί παράγοντες δεν ενδείκνυνται καθώς επηρεάζουν την δομή της παραγόμενης κυτταρίνης και τον βακτηριακό μεταβολισμό. Η κατάψυξη με την χρήση DMSO αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική με υψηλά ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων και καμία επιρροή στην δομή της κυτταρίνης. Τέλος η ξήρανση των βακτηριακών κυττάρων με την χρήση σταγόνων ζελατίνης δεν επηρέασε την δομή της κυτταρίνης ούτε τις κινητικές παραμέτρους, αλλά είχε χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων (Wiegand et al., 2006).

## 1.6 Βιοσύνθεση βακτηριακής κυτταρίνης

Η βιοσύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων που περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό ενζύμων, καταλυτικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Κατά την διαδικασία συντίθενται η ουριδίνη της διφωσφογλυκόζης (UDP-Glc), η οποία είναι πρόδρομη δομή της κυτταρίνης, με επόμενο βήμα τον πολυμερισμό της γλυκόζης σε  $\beta(1\rightarrow4)$  αλυσίδες γλυκάνης και σύνδεσή τους σε μια πλεγματούδη δομή αποτελούμενη από εκατοντάδες ή και χιλιάδες αλυσίδες κυτταρίνης.

Η μεταβολική οδός που ακολουθεί το βακτήριο *A. xylinum* για την σύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης, η οποία αποτελεί και το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πηγών άνθρακα εξαρτάται από την φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου και περιλαμβάνει είτε τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών είτε τον κύκλο του Krebs σε συνδυασμό με τη γλυκονεογένεση (Ross et al., 1991; Tonouchi et al., 1996). Το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης δεν λαμβάνει χώρα στα οξικοπαράγωγα βακτήρια αφού δεν παράγουν το κρίσιμο ένζυμο της οδού, την φωσφοφρουκτο-κινάση (EC 2.7.1.56) (Ross et al., 1991). Η σύνθεση της βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτήριο *A. xylinum* είναι στενά συνδεδεμένη με καταβολικές διεργασίες οξείδωσης και καταναλώνει το 10 % της ενέργειας που προέρχεται από τις αναβολικές αντιδράσεις (Weinhouse, 1977), ενώ δεν εμπλέκεται με άλλες αναβολικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεϊνοσύνθεσης (Ross et al., 1991).

Ο *A. xylinum* μετατρέπει πολλές πηγές άνθρακα, όπως εξόζες, γλυκερόλη, διυδροξυακετόνη, πυροσταφυλικό οξύ και διάφορα δικαρβοξυλικά οξέα, σε κυτταρίνη με απόδοση 50 %. Οι τελευταίες ενώσεις εισέρχονται στον κύκλο του Krebs και λόγω αποκαρβοξυλίωσης του οξαλοξικού οξέος σε πυροσταφυλικό υφίστανται μετατροπή σε εξόζες μέσω της γλυκονεογένεσης όπως συμβαίνει και με τη γλυκερόλη, τη διυδροξυακετόνη και άλλα ενδιάμεσα του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών.

Η πρόδρομη ένωση της κυτταρίνης, η UDP-Glc, η οποία αποτελεί προϊόν συμβατικών μονοπατιών πολλών μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων και των φυτών, συντίθενται από την μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφατο-γλυκόζη (Glc-6-P) καταλυόμενη από το ένζυμο γλυκοκινάση, ακολουθεί ισομερίωση σε Glc- $\alpha$ -1-P, η οποία καταλύεται από το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση, και τέλος η μετατροπή της τελευταίας ένωσης σε UDP-Glc από το ένζυμο πυροφωσφορυλάση. Το τελευταίο

ένζυμο φαίνεται να είναι και το κρίσιμο ένζυμο για την κυτταρινοσύνθεση αφού κάποια κυτταρινοπαράγωγα κύτταρα (CEL) εκδηλώνουν ανεπάρκεια σύνθεσης αυτού του ενζύμου (Valla et al., 1989) αν και εμφανίζουν παραγωγή του ενζύμου συνθάση της κυτταρίνης (CS). Επιπλέον, η ενεργότητα αυτού του ενζύμου ποικίλλει μεταξύ στελεχών του *A. xylinum* και η υψηλότερη τιμή ανιχνεύτηκε στους πιο αποτελεσματικούς παραγωγούς κυτταρίνης όπως ο *A. xylinum ssp. sucrofermentans* BPR 2001. Το στέλεχος αυτό προτιμά την φρουκτόζη ως πηγή άνθρακα, εμφανίζει υψηλή ενεργότητα της φωσφο-γλυκο-ισομεράσης και κατέχει σύστημα φωσφο-τρανφερασών εξαρτώμενο από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό.

### **Μηχανισμός βιοσύνθεσης**

Η σύνθεση της κυτταρίνης από τον *A. xylinum*, όπως και από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που παράγουν κυτταρίνη, συμπεριλαμβανομένων και των φυτών, αποτελείται από δύο στάδια:

#### **(i) Τον σχηματισμό β-(1→4) αλυσίδων γλυκάνης και τον πολυμερισμό τους**

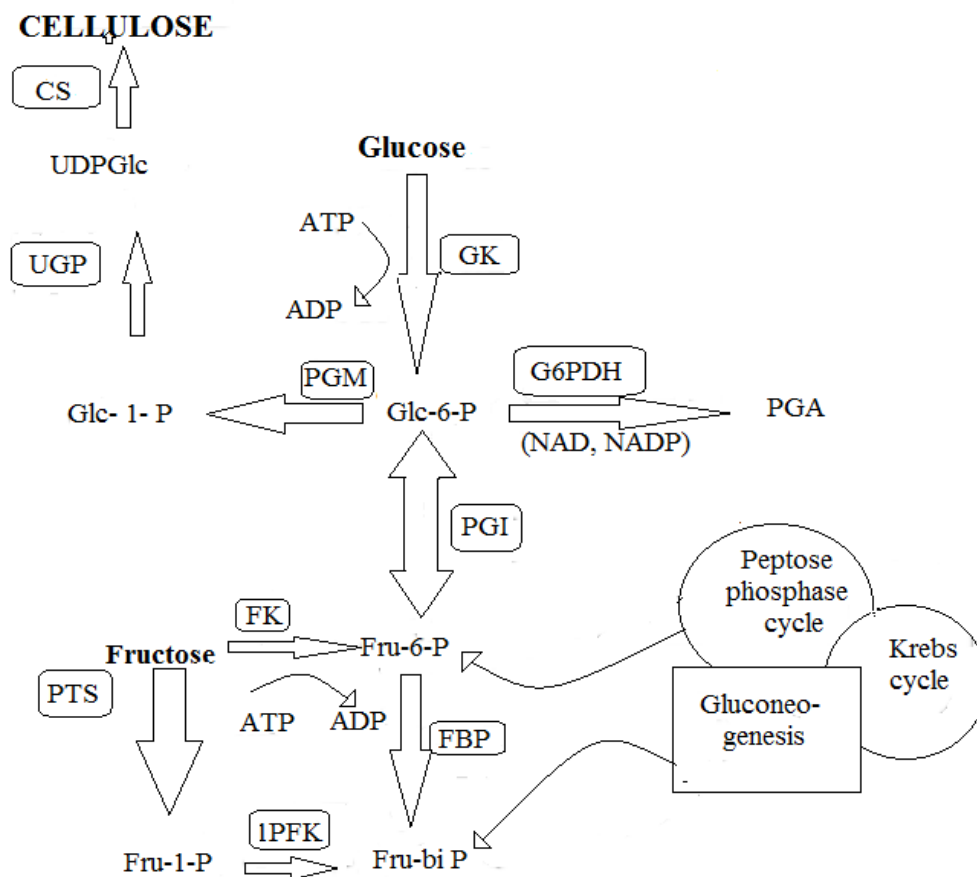
Το ένζυμο συνθάση της κυτταρίνης καταλύει την βιοσύνθεσή της πολυμερίζοντας την γλυκόζη σε β-(1→4) ομάδες γλυκάνης. Ένα βακτηριακό κύτταρο μπορεί να πολυμερίσει έως και 108 μόρια γλυκόζης ανά ώρα (Hestrin and Schramm, 1954), τα οποία συσσωματώνονται σε υποϊνίδια (προ-κυτταρινικό πολυμερές). Ο σχηματισμός τους λαμβάνει χώρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η γωνία στρέψης μεταξύ δύο γειτονικών υπολειμμάτων γλυκόζης στο μόριο της κυτταρίνης είναι 180°. Έχουν αναφερθεί δύο υποθέσεις για το μηχανισμό του *A. xylinum*. Κατά την πρώτη δεν συμπεριλαμβάνεται λιπιδικό ενδιάμεσο κατά τον πολυμερισμό των β-(1→4) ομάδων γλυκάνης, ενώ κατά την δεύτερη συμπεριλαμβάνεται.

#### **(ii) Τον σχηματισμό της αλυσίδας της κυτταρίνης**

Τα μόρια του προ-κυτταρινικού πολυμερούς εξωθούνται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον σχηματίζοντας πρωτοϊνίδια (ή μικροϊνίδια) διαμέτρου 2-4 nm. Αυτά τα μικροϊνίδια φαίνεται να είναι η αρχική μορφή του κυτταρινικού προϊόντος. Τα μικροϊνίδια κρυσταλλοποιούνται σε ταινίες κυτταρίνης, οι οποίες με την σειρά τους αλληλεπιδρούν με άλλες από γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα δισδιάστατο επίπεδο. Τέλος, παράλληλα επίπεδα αλληλεπιδρούν το ένα με το άλλο με δεσμούς



υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals, σχηματίζοντας ένα ζελατινώδες εναιώρημα στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας (Breet, 2000). Η διαδικασία σχηματισμού των αλυσίδων κυτταρίνης, συχνά περιγράφεται ως κυτταρικά κατευθυνόμενη διότι, αν και λαμβάνει χώρα εξωκυτταρικά, ο αμοιβαίος προσανατολισμός και η σύνδεση των αλυσίδων γλυκάνης, ο σχηματισμός των ινιδίων και ταινιών κυτταρίνης διέπονται από την αρχική διάταξη των πόρων εξώθησης του κυττάρου.



**Σχήμα 1.1:** Μεταβολικό μονοπάτι του άνθρακα στον *A. xylinum*. CS, συνθάση της κυτταρίνης (EC 2.4.2.12); FBP, φρουκτόζη -1,6- διφωσφορική φωσφατάση (EC 3.1.3.11); FK, γλυκοκινάση (EC 2.7.1.2); G6PDH, γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση (EC 1.1.1.49); 1PFK, φρουκτόζη-1-φωσφορική κινάση (EC 2.7.1.56); PGI, φωσφο-γλυκο-ισομεράση, PMG, φωσφο-γλυκο-μουτάση (EC 5.3.1.9); PTS, σύστημα φωσφο-τρανσφερασών; UGP, πυροφωσφορυλάση, UDPGLc (EC 2.7.7.9); Fru-bi-P, 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη; Fru-6-P, 6-φωσφορική φρουκτόζη; GLc-6(1)-P, 6 (1)-φωσφορική γλυκόζη; PGA, φωσφο-γλουκονικό οξύ; UDPGc, ουριδίνη διφωσφογλυκόζης.

## 1.7 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης μέσω ζύμωσης

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης είναι το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (οι πηγές άνθρακα και αζώτου και τα ιχνοστοιχεία), οι συνθήκες της ζύμωσης και ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Ο σχεδιασμός του θρεπτικού μέσου είναι πολύ σημαντικός για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και τον ελεγχόμενο σχηματισμό των προϊόντων ζύμωσης.

Συνήθως, η γλυκόζη και η σακχαρόζη χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Ωστόσο, και άλλες πηγές άνθρακα όπως η φρουκτόζη, η μαλτόζη, η ξυλόζη, το άμυλο και η γλυκερόλη έχουν δοκιμαστεί. Η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκόζης είναι επίσης σημαντική εξαιτίας του σχηματισμού γλυκονικού οξέος ως παραπροϊόν, το οποίο μειώνει το pH της καλλιέργειας και επομένως την παραγωγή της κυτταρίνης. Οι Keshk και Sameshima (2006) διερεύνησαν τον σχηματισμό γλυκονικού οξέος και βακτηριακής κυτταρίνης υπό την παρουσία λιγνοσουλφονικών, όπου η παραγωγή γλυκονικού οξέος μειώθηκε ενώ παράλληλα η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης αυξήθηκε. Η αναστολή του σχηματισμού γλυκονικού οξέος οφείλεται στα αντιοξειδωτικά και στις πολυφαινολικές ενώσεις που ανιχνεύονται στα λιγνοσουλφονικά.

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται, εκτός από πρόσθετη πηγή άνθρακα και ως παράγοντας εξάλειψης της αυθόρμητης μετάλλαξης ή εκφύλισης των μη κυτταρινοπαραγωγών (Cel<sup>-</sup>) στελεχών του *A. xylinum*. Η προσθήκη αιθανόλης έχει αναφερθεί ότι αύξησε την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης από 1,30 g/L σε 2,31 g/L στον *G. hansenii*. Άλλη μελέτη έδειξε ότι η προσθήκη 1,4 % (w/w) αιθανόλης στο μέσο αύξησε την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης στο 15,1 g/L, το οποίο είναι τέσσερις φορές υψηλότερο από την παραγωγή κυτταρίνης χωρίς αιθανόλη.

Έχει, επίσης, μελετηθεί η επίδραση της προσθήκης οργανικών οξέων. Η απόδοση της κυτταρίνης αυξήθηκε από 0,6 g/L σε 3,8 g/L με την προσθήκη 20 g/L οξικού οξέος. Η προσθήκη άλλων οργανικών οξέων όπως το ηλεκτρικό, το γαλακτικό και το γλυκονικό οξύ δεν αύξησε την απόδοση παραγωγής της κυτταρίνης. Παρόλα αυτά, η χρήση του γαλακτικού οξέος διαπιστώθηκε ότι έχει θετική επίδραση στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης όταν προστίθενται σε μέσο που περιέχει φρουκτόζη 4 % (w/v) και υγρό απόβλητο από την άλεση του καλαμποκιού (corn steep liquor- CSL), εκχύλισμα ζυμών (yeast extract) ή πεπτόνη ως πηγή αζώτου.

Θεωρήθηκε ότι το γαλακτικό οξύ λειτουργούσε ως πηγή ενέργειας και όχι ως υπόστρωμα κατά την βιοσύνθεση της κυτταρίνης (Naritomi et al., 1998).

Το άζωτο είναι το κύριο συστατικό των πρωτεϊνών, το οποίο είναι απαραίτητο για τον κυτταρικό μεταβολισμό και αποτελεί το 8-14 % της ξηρής κυτταρικής βιομάζας των βακτηρίων. Η επίδραση ποικίλων πηγών αζώτου στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης έχει μελετηθεί. Η χρησιμοποίηση υδρολυμένης καζεΐνης είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή 5 g/L κυτταρίνης, ενώ η πεπτόνη 4,8 g/L από τον μικροοργανισμό *A. xylinum*. Η προσθήκη επιπλέον ποσότητας πηγής αζώτου αυξάνει την παραγωγή της βιομάζας, αλλά μειώνει την παραγωγή της κυτταρίνης.

Μελετήθηκε, επίσης, η επίδραση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε διαφορετικές πηγές άνθρακα. Εκχύλισμα ζύμης προστέθηκε στο μέσο της καλλιέργειας σε ένα εύρος από 5 g/L έως 60 g/L, ενώ η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα παρέμεινε σταθερή στα 20 g/L. Το μέσο που περιείχε 40 g/L εκχυλίσματος ζύμης είχε ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη απόδοση σε κυτταρίνη (6,7 g/L) (Yang et al., 1998).

Η βάση για τις περισσότερες έρευνες είναι το μέσο καλλιέργειας που αναπτύχθηκε από τους Hestrin και Schramm και το οποίο περιλαμβάνει ως πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη, 0,5 % το καθένα. Από όλες τις πηγές αζώτου που έχουν χρησιμοποιηθεί, το CSL φαίνεται να είναι το πιο αποτελεσματικό για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης.

Τέλος, ορισμένα αμινοξέα όπως είναι η μεθειονίνη και το γλουταμινικό οξύ αναφέρονται ως απαραίτητα. Συγκεκριμένα, η μεθειονίνη έχει δείξει σημαντική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή της κυτταρίνης σε σύγκριση με μέσο που δεν περιείχε αυτό το αμινοξύ. Βιταμίνες όπως η πυριδοξίνη, το νικοτινικό οξύ, το p-αμινοβενζοϊκό οξύ και η βιοτίνη έδειξαν, επίσης, ότι είναι σημαντικές για την κυτταρική ανάπτυξη και παραγωγή της κυτταρίνης. Ωστόσο, κάποιοι μελετητές δεν παρατήρησαν καμία θετική επίδραση στην βιοσύνθεση της κυτταρίνης με την χρήση βιταμινών (Jonas and Farah, 1997).

Η επιλογή της μεθόδου παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης εξαρτάται από την τελική χρήση του βιοπολυμερούς λαμβάνοντας υπόψη ότι η δομή, οι φυσικές και οι μηχανικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρίνης επηρεάζονται άμεσα από τις συνθήκες καλλιέργειας. Υπάρχουν δύο μέθοδοι για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης: (α) υπό στατικές συνθήκες καλλιέργειας, κατά τις οποίες η κυτταρίνη βιοσυντίθεται υπό μορφή μεμβράνης στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας, (β) υπό

αναδεδυόμενες συνθήκες όπου σχηματίζονται σφαιρίδια ή κροκκιδώματα βακτηριακής κυτταρίνης άνισου μεγέθους (Watanabe et al 1998). Ενώ οι στατικές συνθήκες καλλιέργειας έχουν διεξοδικά διερευνηθεί και περιγραφεί, οι αναδεδυόμενες συνθήκες προκαλούν αρκετά προβλήματα, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η αστάθεια του βακτηριακού στελέχους, η μη-Νευτώνεια συμπεριφορά κατά την ανάμιξη της βακτηριακής κυτταρίνης και η μη ομαλή παροχή του απαραίτητου οξυγόνου (Czaja et al. 2004). Παρόλα τα προαναφερθέντα εμπόδια, μερικοί ερευνητές προτείνουν τις υπό ανάδευση συνθήκες καλλιέργειας ως τις πιο κατάλληλες για μια οικονομικά βιώσιμη παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης σε βιομηχανική κλίμακα (Ross et al 1991; Yoshinaga et al. 1997; Czaja et al. 2004).

Η θερμοκρασία είναι μια κρίσιμη παράμετρος για την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Στην πλειοψηφία των πειραμάτων η μεγαλύτερη παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης διαπιστώθηκε σε θερμοκρασίες μεταξύ 28 και 30 °C (Chawla et al., 2008).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η βέλτιστη περιοχή pH για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης από το βακτήριο *A. xylinum* είναι μεταξύ των τιμών 4-7. Οι Hestrin και Schramm (1954) θεωρούν σημαντικό το pH να είναι μικρότερο από 7. Οι Fiedler et al (1989) παρατήρησαν pH 5-7 σαν βέλτιστο, ενώ οι Masaoka et al (1993) υπέδειξαν τιμές pH 4-6 ως βέλτιστο εύρος για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, όπου τουλάχιστον το 80 % της παρατηρούμενης παραγωγής κυτταρίνης επετεύχθη όταν το pH του μέσου ήταν 3,5 και 7. Οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν pH 5 (Ishikawa et al. 1995; Oikawa et al. 1995; Matsuoka et al. 1996; Joris et al. 1990; Watanabe et al. 1995) ή 6 (Masaoka et al. 1993; Hestrin et al. 1954) στο ερευνητικό τους έργο.

Η D-γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, εκτός από το να ενεργεί ως πηγή ενέργειας και πρόδρομος ουσία της κυτταρίνης μετατρέπεται και σε (κετο) γλυκονικά οξέα. Αυτό το χαρακτηριστικό μειώνει όχι μόνο την συνολική απόδοση κυτταρίνης, αλλά και το pH του μέσου σε μη βέλτιστες τιμές για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και τη σύνθεση της κυτταρίνης. Κυρίως λόγω αυτού του γεγονότος, εφαρμόζοντας μια υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκόζης, με στόχο την επίτευξη υψηλότερων επιπέδων παραγωγής της κυτταρίνης δεν αυξάνει την παραγωγή αυτού του πολυμερούς αναλογικά, επειδή η περίσσεια γλυκόζης μετατρέπεται σε (κετο) γλυκονικό οξέα με μια συνακόλουθη μείωση του pH (Masaoka et al. 1995; Schmauder et al. 1994). Συνεπώς, η χρήση μιας ελεγχόμενης ως προς το pH ζύμωσης είναι αναπόφευκτη,

αλλά αυτό είναι πράγματι δύσκολο να επιτευχθεί σε στατικές συνθήκες καλλιέργειας. Οι Vandamme et al (1998) ανέπτυξαν μια επιτυχημένη εναλλακτική λύση με την χρήση οξικού οξέος ως συν-υπόστρωμα σε ζυμώσεις για την παραγωγή της κυτταρίνης με το γένος *Acetobacter sp.* LMG 1518. Το σκεπτικό ήταν ότι ο μικροοργανισμός αυτός μπορεί να οξειδώσει το οξικό οξύ σε CO<sub>2</sub> και νερό δημιουργώντας έτσι επιπλέον ATP και ευνοώντας την επιθυμητή περιοχή pH. Αν και το οξικό οξύ δεν οδηγεί άμεσα στον σχηματισμό κυτταρίνης μειώνει τη αφομοίωση της γλυκόζης που θα χρησιμοποιούταν κανονικά για την σύνθεση ATP οδηγώντας έτσι σε μια πιο αποτελεσματική μετατροπή της γλυκόζης σε κυτταρίνη. Επίσης ο καταβολισμός του οξικού οξέος οδηγεί σε μια αύξηση του pH αντισταθμίζοντας έτσι την μείωσή του λόγω του σχηματισμού (κετο) γλυκονικών οξέων. Τέλος, οι Noro et al. (2004) εκμεταλλεύτηκαν την ρυθμιστική ικανότητα του CSL για την διατήρηση του pH στην βέλτιστη περιοχή καθώς περιέχει διάφορες ρυθμιστικές ουσίες. Όταν χρησιμοποιήθηκε μέσο καλλιέργειας το οποίο περιείχε CSL και φρουκτόζη, το pH διατηρήθηκε εντός του βέλτιστου εύρους και επιτεύχθηκε υψηλή παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

## Σκοπός της παρούσας μελέτης

Για να περιοριστεί το κόστος παραγωγής της βακτηριακής κυτταρίνης και να γίνει δυνατή η εμπορευματοποίησή της σε μεγάλη κλίμακα πρέπει να βελτιωθεί η παραγωγικότητα της ζύμωσης.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μελετήθηκε η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο εμπορικά σάκχαρα όπως η γλυκόζη και συνδυασμός των σακχάρων γλυκόζη-σακχαρόζη-φρουκτόζη. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν διάφορα παραπροϊόντα ή υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση του pH, του ρυθμού ανάδευσης, του λόγου επιφάνειας προς τον όγκο και τέλος του εμβολίου στην παραγωγικότητα της βακτηριακής κυτταρίνης.

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 είχαν διάρκεια 10 ημέρες και διεξήχθησαν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Hestrin-Schramm. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα pH στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Η βακτηριακή κυτταρίνη παρουσίασε μεγαλύτερη συγκέντρωση (4 g/L) όταν το pH του μέσου καλλιέργειας ρυθμιζόταν στο βέλτιστο εύρος (pH 6), σε σχέση με τις ζυμώσεις όπου δεν υπήρχε ρύθμιση του pH (2,97 g/L). Σε επόμενη σειρά πειραμάτων εξετάστηκαν τρεις διαφορετικοί ρυθμοί ανάδευσης 180 rpm, 100 rpm και 40 rpm και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις της βακτηριακής κυτταρίνης που προέκυψαν ήταν 2 g/L, 2,6 g/L και 4 g/L. Ακολούθησαν ζυμώσεις κατά τις οποίες αξιολογήθηκε η επίδραση της επιφάνειας του θρεπτικού μέσου στην οποία βιοσυντίθεται το πολυμερές. Για τον λόγο αυτό, μελετήθηκαν διαφορετικοί λόγοι επιφάνειας προς τον όγκο που καταλαμβάνει το θρεπτικό μέσο. Η μεγαλύτερη παραγωγή (1,88 g/L) εμφανίστηκε σε λόγο  $\lambda=0,5 \text{ cm}^{-1}$ , ενώ η μικρότερη (1,04 g/L) σε λόγο  $\lambda=0,068 \text{ cm}^{-1}$ .

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία διέφεραν ως προς την ποσότητα του εμβολίου. Τα εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την μορφή μεμβρανών. Τρεις σειρές πειραμάτων διεξήχθησαν με ένα, δύο και τρία εμβόλια αντιστοίχως. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηριακής κυτταρίνης (1,4 g/L) επιτεύχθηκε με την μικρότερη ποσότητα εμβολίου. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ζύμωση χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα συνδυασμό των σακχάρων γλυκόζη (67 %), σακχαρόζη (7 %) και φρουκτόζη (26 %), με σκοπό να προσομοιωθεί η σύσταση του χυμού του πορτοκαλιού. Ως βάση και σε αυτή τη ζύμωση ήταν το θρεπτικό μέσο

Hestrin- Schramm και η τελική συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 8,4 g/L

Τέλος, εξετάστηκε η προοπτική αξιοποίησης στερεών αμυλοπρωτεϊνούχων αποβλήτων της βιομηχανίας παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής ως ένα πλήρες θρεπτικό μέσο για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Η τελική συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης που επιτεύχθηκε ήταν 4,6 g/L. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε θρεπτικό υπόστρωμα χυμό από πορτοκάλι όπου η τελική συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 13,4 g/L.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Ζύμωση Στερεής Κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF)

Η ζύμωση στερεής κατάστασης (SSF) πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παραγωγή ακατέργαστων αμυλολυτικών ενζύμων ( $\alpha$ -αμυλάσες,  $\beta$ -αμυλάσες, γλυκοαμυλάσες) καθώς και πρωτεολυτικών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια για την υδρόλυση των αμυλούχων αποβλήτων προς το μονομερές τους, την γλυκόζη, και συνεπώς την μετατροπή των αποβλήτων σε πλούσιο θρεπτικό μέσο για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης.

#### 2.1.1 Βιολογικό Υλικό

Για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 το οποίο διατηρούνταν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό μορφή σπορίων σε γυάλινα φιαλίδια με silica gel στους 4 °C.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, τα στελέχη ενυδατώθηκαν και απομονώθηκαν για να εξασφαλιστεί η καθαρότητά τους. Έπειτα, αποθηκεύτηκαν στους 4 °C σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με 2% w/v nutrient άγαρ και 5 % w/v πίτυρο σίτου. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν ανανέωση των μυκήτων, ώστε να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους.

#### 2.1.2 Εμβόλιο για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης με τους *Aspergillus awamori*

Για τις ζυμώσεις στερεής κατάστασης χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο σπόρια του *A. awamori*. Η ποσότητα του εμβολίου για κάθε φιάλη αντιστοιχούσε σε  $10^6$ - $10^8$  cfu (Koutinas et al., 2001). Το εμβόλιο αποτελούταν από 2 mL εναιωρήματος σπορίων το οποίο προέκυπτε μετά την προσθήκη 10 mL απιονισμένου νερού, που περιείχε Tween 80 (0,01 %, v/v) στους κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με τον



ανεπτυγμένο μύκητα. Στη συνέχεια, κωνικές φιάλες των 250 mL ίδιας σύνθεσης με αυτή των δοκιμαστικών σωλήνων και προσθήκη 50 mL αποσταγμένου νερού με μια σταγόνα 0,01 % (v/v) Tween 80, επώαστηκαν με τα 2 mL εναιωρήματος και τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 30 °C για περίπου 4 ημέρες ώστε να επιτευχθεί πλήρης ανάπτυξη των μυκήτων. Ο ρυθμός ανάδευσης για τον *A. awamori* ήταν 180 rpm.

Όλα τα υλικά, σκέυη και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min. Επίσης όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής).

### **2.1.3 Ζύμωση Στερεής Κατάστασης του μύκητα *Aspergillus awamori***

Η ζύμωση στερεής κατάστασης (SSF) πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Σε κάθε κωνική φιάλη προστίθεντο 5 g πίτυρο σίτου, το οποίο αποτελεί παραπροϊόν της άλεσης σίτου. Οι φιάλες πωματίζονταν με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο στους 120 °C για 20 min. Μετά την αποστείρωση ακολούθησε ο εμβολιασμός (9 mL) υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής) των κωνικών φιαλών με εναιώρημα σπορίων του μύκητα φροντίζοντας να διαβραχεί ομοιόμορφα η επιφάνειά τους, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη ανάπτυξη. Για την δημιουργία του εναιωρήματος χρησιμοποιήθηκαν 50 mL απιονισμένο νερό και γαλακτοματοποιητής Tween 80 για κάθε κωνική με τον ανεπτυγμένο μύκητα. Με σκοπό την απελευθέρωση των σπορίων του μύκητα ακολούθησε έντονη ανάδευση (με vortex). Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο με ρυθμό ανάδευσης 180 rpm, στους 30 °C για δύο (2) ημέρες.

## **2.2 Υδρόλυση αμυλούχων υποστρωμάτων προς παραγωγή θρεπτικού μέσου πλούσιο σε γλυκόζη και άζωτο**

Σκοπός των υδρολύσεων ήταν να παραχθεί υδατικό μέσο καλλιέργειας πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στην κατηγορία των βιομηχανικών αποβλήτων, υποπροϊόντων ή παραπροϊόντων και αποτελεί ανανεώσιμη πρώτη ύλη.

Το στερεό υπόστρωμα της ζύμωσης που περιείχε την μυκητιακή μάζα αναμείχθηκε με 500 mL απεσταγμένο νερό σε μπλέντερ κουζίνας και μεταφέρθηκε σε φιάλη Duran 1 L η οποία περιείχε ποσότητα αλευρούχων υπολειμμάτων ίση με 100 g/L. Για κάθε φιάλη Duran χρησιμοποιήθηκαν δύο κωνικές φιάλες της ζύμωσης στερεής κατάστασης (SSF). Έπειτα οι φιάλες Duran τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 55 °C υπό ανάδευση με μαγνητικούς αναδευτήρες για 24 h.

Μετά το πέρας της υδρόλυσης εφαρμόστηκε φιλτράρισμα με τούλι για να απομακρυνθούν τα πολλά στερεά και στη συνέχεια φυγοκέντρωση για 15 min (3900 rpm, 4 °C). Το υπερκείμενο υγρό που παραλήφθηκε, αποθηκεύτηκε σε κατάψυξη μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας

Όλα τα υλικά και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο πριν τη χρήση τους στους 120 °C για 20 min ενώ όλοι οι χειρισμοί έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής.

## **2.3 Προετοιμασία των υδρολυμάτων για την χρήση τους σε πειράματα ζυμώσεων προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης**

Στα παραγόμενα υδρολύματα προσδιορίστηκε το άζωτο ελεύθερων αμινομάδων με την φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης (Κεφ. 2.5.1) καθώς και ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Κεφ. 2.5.2). Το pH των υδρολυμάτων ρυθμίστηκε στο εύρος τιμών 5,5-6, το οποίο θεωρείται βέλτιστο για την ανάπτυξη του *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 και την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Η ρύθμιση του pH έγινε με

pH-μετρο τύπου Jenway 3020 και 5M NaOH. Τέλος. Τα υδρολύματα αποστειρώθηκαν με φίλτρο διαμέτρου σπών 0,2 μm (Polycap 36 AS, Fisher).

## 2.4 Υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου (batch) προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκαν υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου με σκοπό την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Μελετήθηκαν διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης με σκοπό να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

### 2.4.1 Βιολογικό υλικό

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης στην παρούσα μελέτη ήταν το *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 (Toyosaki et al. 1996, Yamada et al. 2012). Ο μικροοργανισμός προμηθεύτηκε από το Ινστιτούτο Leibniz-DSMZ της Γερμανίας (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) ενώ είχε απομονωθεί από μαυροκέρασο.

Το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε μετά την παραλαβή του στελέχους στην λυοφιλωμένη μορφή είχε της εξής σύσταση: γλυκόζη 100 g/L, yeast extract 10 g/L, CaCO<sub>3</sub> 20 g/L, άγαρ 15 g/L. Το pH ρυθμίστηκε στο 6,8 ενώ η θερμοκρασία επώασης στους 28 °C. Τρυβλία Petri πληρώθηκαν με το μέσο καλλιέργειας και εφαρμόστηκε η τεχνική επίστρωσης με χρήση μικροβιακού κρίκου.

Το ανθρακικό ασβέστιο λειτουργεί ως ρυθμιστικό και δημιουργεί ένα αδιαφανές στρώμα γαλατερού χρώματος. Παραγωγή οξέος το οποίο αντιδρά με το CaCO<sub>3</sub> πραγματοποιείται κατά την διάρκεια ανάπτυξης του στελέχους με αποτέλεσμα να δημιουργούνται διαυγείς ζώνες κάτω από τις αποικίες.

Το βακτηριακό στέλεχος αποθηκεύτηκε στους -80 °C σε φιαλίδια ειδικού τύπου (2 mL) που περιείχαν 1 mL γλυκερόλη και 1 mL εμβολίου- HS-γλυκόζη.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του εμβολίου ήταν το Hestrin- Schramm (HS-γλυκόζη) (Schramm & Hestrin, 1954) το οποίο περιείχε τα εξής συστατικά: γλυκόζη 20 g/L, yeast extract 5 g/L, βακτηριακή πεπτόνη 5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.7 g/L, κίτρικό οξύ 1,15 g/L. Το pH του μέσου

ρυθμίστηκε στο 6 με προσθήκη 5M NaOH. Η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C και με ρυθμό ανάδευσης 120 rpm διήρκησε δύο (2) ημέρες.

#### **2.4.2 Θρεπτικά υποστρώματα**

Η βάση για όλες τις ζυμώσεις ήταν το μέσο καλλιέργειας Hestrin- Schramm (HS-γλυκόζη) (Κεφ. 2.4.1) το οποίο σε κάθε πείραμα διαφοροποιούταν ως προς την πηγή άνθρακα διατηρώντας όμως σταθερές τις αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων (20 g/L) και αζώτου (350 mg FAN/L).

##### **Πηγές άνθρακα**

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν εμπορικές πηγές σακχάρων, κυρίως γλυκόζη, καθώς επίσης και συνδυασμός γλυκόζης-φρουκτόζης-σακχαρόζης, αμυλούχα υδρολύματα (Κεφ. 2.2) καθώς και χυμός από πορτοκάλια. Ο χυμός πορτοκαλιού είναι πλούσιος σε γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη. Τα ποσοστά των συγκεκριμένων σακχάρων στο πορτοκάλι ήταν αντίστοιχα 67 %, 26 % και 7 %.

##### **Πηγές αζώτου**

Οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνδυασμός πεπτόνης και yeast extract σε αναλογίες 5 g/L το καθένα (350 mg FAN/L).

#### **2.4.3 Συνθήκες ανάπτυξης**

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL με ενεργό όγκο 50 mL υπό μικροαερόβιες συνθήκες. Το εμβόλιο καταλάμβανε το 10 % v/v του όγκου και το pH ρυθμίστηκε στο 6 με χρήση 5M NaOH. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 30 °C όπου για δύο ημέρες ανακινήθηκαν με ρυθμό 120 rpm και στην συνέχεια επικράτησαν στατικές συνθήκες.

Όλα τα υλικά και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 20 min ενώ όλοι οι χειρισμοί έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

#### 2.4.4 Παραλαβή και καθαρισμός της βακτηριακής κυτταρίνης

Η μικροβιακή κυτταρίνη παραλήφθηκε υπό την μορφή ενυδατωμένων μεμβρανών και πλύθηκε με τρεχούμενο νερό βρύσης για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της καλλιέργειας. Στην συνέχεια εμβαπτίστηκε σε 2M NaOH για 24 ώρες με σκοπό την εξουδετέρωση των βακτηριακών κυττάρων. Τέλος πλύθηκε αρκετές φορές με τρεχούμενο νερό βρύσης μέχρι να επιτευχθεί ουδέτερη τιμή pH και τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 30 °C μέχρι να αποκτήσει σταθερό βάρος.

### 2.5 Χημικές αναλύσεις

Για την μελέτη της μεταβολής της πηγής αζώτου συναρτήσει του χρόνου στις υγρές καλλιέργειες προσδιορίστηκε το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων με την φωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης (Κεφ. 2.5.1). Επίσης έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Κεφ. 2.5.2).

#### 2.5.1 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN Analysis)

##### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen, FAN) αμινοξέων και πεπτιδίων που προκύπτουν από την υδρόλυση των πρωτεϊνών είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973).

##### Παρασκευή αντιδραστηρίων

*Αντιδραστήριο χρώσης (Colour reagent):* Αποτελείται από 49,71 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και 60 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  διαλυμένα σε 1 L απεσταγμένου νερού. Το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6,6 και 6,8 γι' αυτό προστίθενται, όποτε κρίνεται αναγκαίο κατάλληλα ποσότητα  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Το αντιδραστήριο χρώσης αποθηκεύεται σε φιάλη Duran σε θερμοκρασία 4 °C.

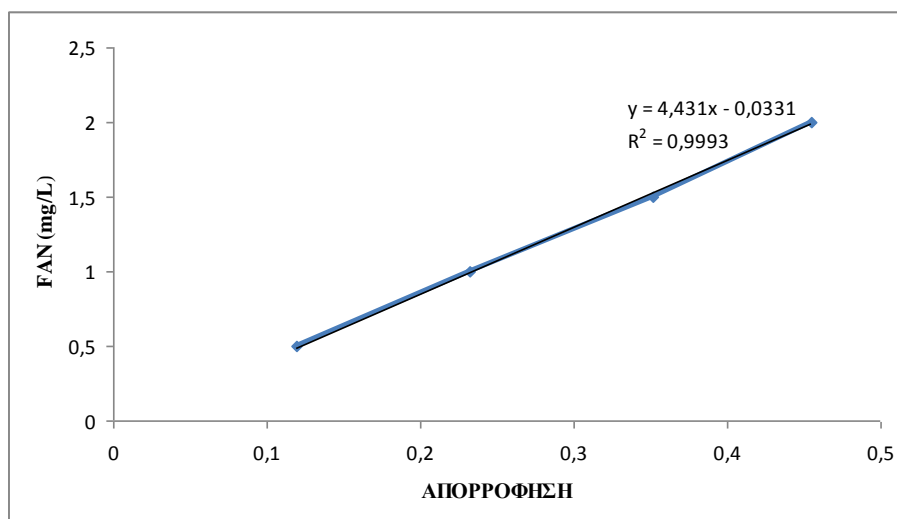
*Αντιδραστήριο αραίωσης (Dilution reagent):* 2 g  $\text{KIO}_3$  διαλύονται σε 616 mL απεσταγμένου νερού. Στην συνέχεια, 384 mL καθαρής αιθανόλης προστίθενται στο διάλυμα, το οποίο τελικά έχει όγκο 1 L.

*Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (Glycine stock solution):* Το διάλυμα παρασκευάζεται με διάλυση 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C.

*Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (Glycine standard solution):* Για να εξασφαλιστεί συγκέντρωση FAN 2 mg/L, 1 mL αποθεματικού διαλύματος γλυκίνης διαλύεται σε 100 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C.

### **Εφαρμογή της μεθόδου**

Αρχικά, 2 mL αραιωμένου δείγματος (σ' αυτή την μελέτη έγινε αραίωση 1:200) μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό καπάκι (τύπου Fison 160 x 16 mm). Παρασκευάστηκαν επίσης ένα πρότυπο και ένα τυφλό διάλυμα. Το πρώτο παρασκευάστηκε με προσθήκη 2 mL πρότυπου διαλύματος γλυκίνης σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα ενώ το δεύτερο με προσθήκη 2 mL απιονισμένου νερού σε ένα δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα 1 mL του αντιδραστηρίου χρώσης μεταφέρθηκε σε κάθε ένα από τους δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι πωματίστηκαν, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση, και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100 °C για 16 min ακριβώς. Στην συνέχεια ακολούθησε ψύξη των δοκιμαστικών σωληνών σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 20 °C για 20 min. Ακολούθως σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 2.5 mL του αντιδραστηρίου αραίωσης και αναδεύτηκαν μέχρι αλλαγής του χρώματος (περίπου 20 sec). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg FAN.



**Γράφημα 2.1:** Καμπύλη αναφοράς αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) με την μέθοδο νινυδρίνης.

### 2.5.2 Μέθοδος χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων έγινε και με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography). Τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν ενώ ο απαιτούμενος όγκος κάθε ένεσης ήταν 20  $\mu\text{L}$ .

#### Αρχή της μεθόδου

Χαρακτηριστικά υγρού χρωματογράφου

Όργανο: Waters 600E

Στήλη (Στατική φάση): Aminex HPX-87H (Bio-rad, Richmond, USA) (30cm x 7,8 ml)

Κινητή φάση: 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  σε δισ-αποσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό.

Ανιχνευτής: RI (410 Waters)

Ροή διαλυτών (κινητής φάσης): 0,6 mL/min

Όγκος ένεσης: 50  $\mu\text{l}$

## 3. Αποτελέσματα

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις όπου μελετήθηκε μια σειρά παραγόντων όπως το pH, ο ρυθμός ανάδευσης, ο λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο ζύμωσης και η ποσότητα του εμβολίου οι οποίοι επηρεάζουν την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης και στην συνέχεια αξιολογήθηκε η δυνατότητα παραγωγής της από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Σε όλα τα πειράματα μελετήθηκε τόσο η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης όσο και η κατανάλωση των σακχάρων και του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων.

### 3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης του pH ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

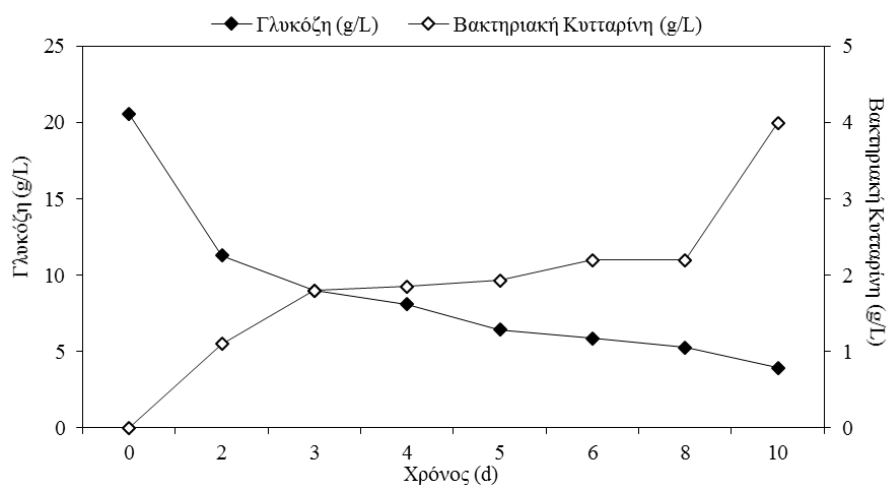
Στόχος της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν η επίδραση του pH ως προς την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι το βέλτιστο εύρος των τιμών του pH της ζύμωσης είναι μεταξύ των τιμών 4-7 (Hestrin and Schramm, 1954). Οι Fiedler et al. (1989) παρατήρησαν βέλτιστες τιμές pH μεταξύ 5-7 για την παραγωγή κυτταρίνης, ενώ οι Masaoka et al. (1993) μεταξύ 4-6. Οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν pH 5-6 στις μελέτες τους (Κεφ. 1.7).

Οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου με το βακτηριακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 διήρκησαν 10 μέρες και μελετήθηκε η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε δύο σειρές πειραμάτων με ρύθμιση pH και χωρίς ρύθμιση του pH στο μέσο καλλιέργειας. Το θρεπτικό υπόστρωμα που επιλέχθηκε ήταν αυτό του Hestrin-Schramm (HS-γλυκόζη) ως στάδιο εκκίνησης για τις ζυμώσεις προς παραγωγή κυτταρίνης. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης διατηρήθηκε σταθερή (20 g/L) ενώ η ρύθμιση του pH στα βέλτιστα επίπεδα έγινε με την προσθήκη NaOH 5 M.

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, το θρεπτικό υπόστρωμα της γλυκόζης μεταβολίστηκε ικανοποιητικά από τα βακτηριακά κύτταρα προς παραγωγή κυτταρίνης και στις δύο ζυμώσεις. Η μεγαλύτερη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης επιτεύχθηκε στην ζύμωση με την ρύθμιση pH (Διάγραμμα 3.1) με τελική συγκέντρωση 4 g/L ενώ στην ζύμωση χωρίς ρύθμιση pH η αντίστοιχη τελική συγκέντρωση της βακτηριακής κυτταρίνης ήταν 2,97 g/L (Διάγραμμα 3.2). Στο

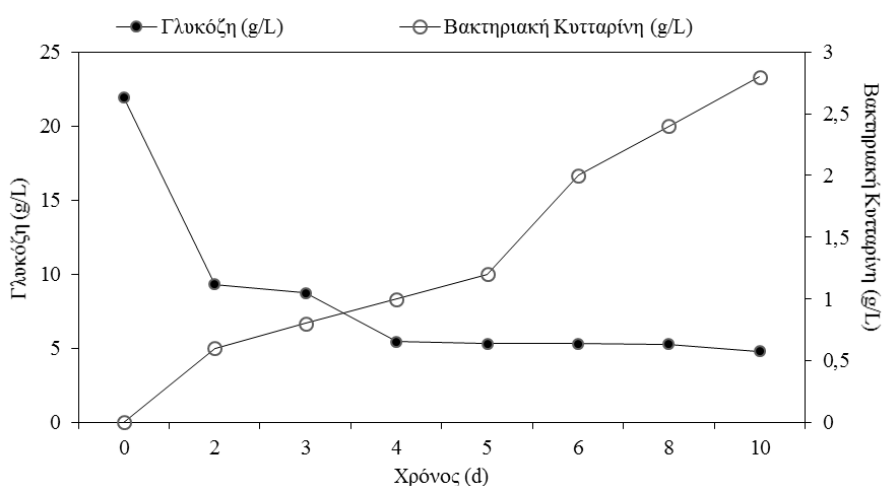


Διάγραμμα 3.3 απεικονίζεται η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και στο Διάγραμμα 3.4 παρουσιάζεται το επί της εκατό ποσοστό κατανάλωσης της γλυκόζης στις δύο ζύμωσης.



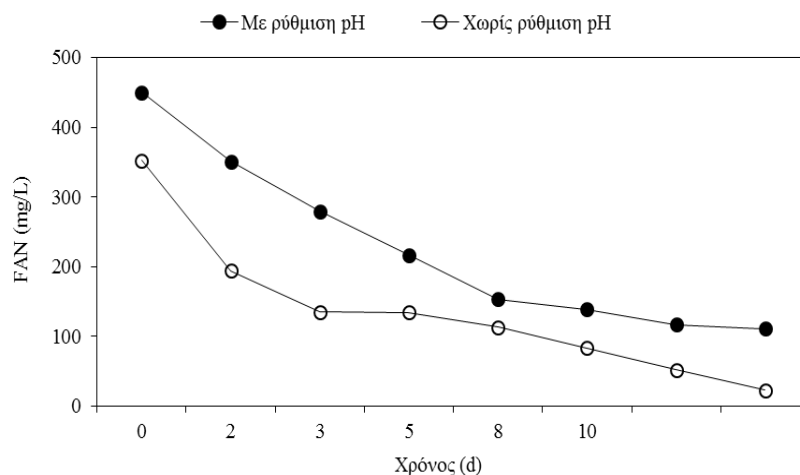
**Διάγραμμα 3.1** Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια της ελεγχόμενης ως προς το pH ζύμωσης.

Στο Διάγραμμα 3.1 παρατηρείται ότι η κατανάλωση του υποστρώματος από το βακτηριακό στέλεχος γίνεται με πολύ γρήγορους ρυθμούς τις δύο πρώτες μέρες ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός αυτός μειώνεται. Το ίδιο ακριβώς παρατηρείται και στην παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης, όπου από την δεύτερη κιόλας μέρα η συγκέντρωσή της έφτασε τα 1,1 g/L για να καταλήξει στην τελική τιμή των 4 g/L την δέκατη μέρα.



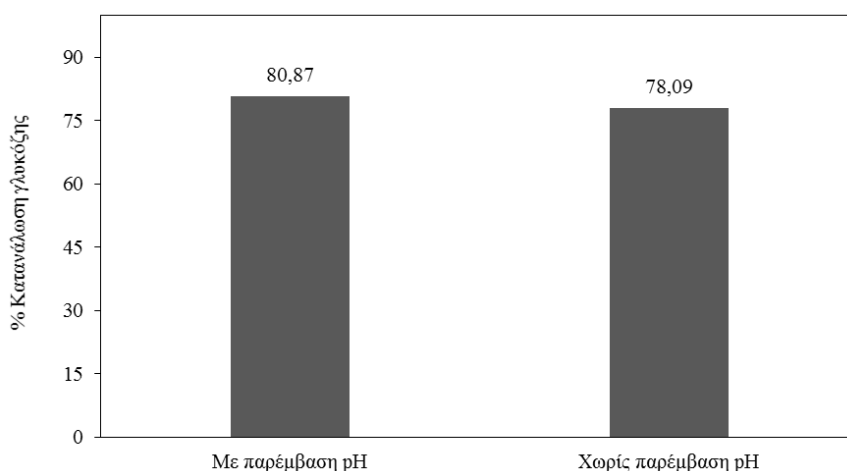
**Διάγραμμα 3.2** Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια ζύμωσης χωρίς παρέμβαση στο pH.

Στο Διάγραμμα 3.2 φαίνεται ότι η κατανάλωση του υποστρώματος είναι πολύ γρήγορη τις πρώτες μέρες. Την δεύτερη μέρα η γλυκόζη αφομοιώθηκε με γρήγορο ρυθμό και έφτασε τα 9,29 g/L ενώ από τα μέσα της ζύμωσης ο ρυθμός κατανάλωσής της μειώνεται. Αντίθετα, η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης κατά την δεύτερη μέρα είναι μικρή συγκριτικά με την ποσότητα του σακχάρου που έχει καταναλωθεί. Η τελική συγκέντρωση της παραγόμενης κυτταρίνης ήταν 2,97 g/L.



**Διάγραμμα 3.3** Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζυμώσεων με ή χωρίς ρύθμιση του pH του θρεπτικού μέσου.

Όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 3.3, ο ρυθμός κατανάλωσης του FAN είναι παρόμοιος και στα δύο πειράματα και ο μικροοργανισμός αφομοίωσε 310-370 mg FAN/L.



**Διάγραμμα 3.4** Επί τοις εκατό ποσοστό κατανάλωσης γλυκόζης μετά από 10 μέρες ζύμωσης.

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 3.4 διαπιστώνεται ότι και στις δύο ζυμώσεις η κατανάλωση του υποστρώματος ήταν υψηλή με αντίστοιχες τιμές 80,87 % και 78,09 %.

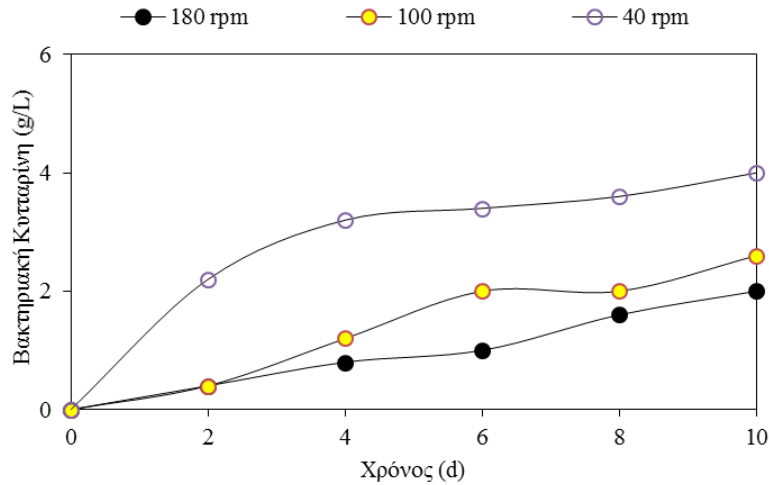
Συμπερασματικά, η διατήρηση του pH στο βέλτιστο εύρος αύξησε την παραγωγή της κυτταρίνης η οποία έφτασε τα 4 g/L, ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση στην ζύμωση όπου δεν είχαμε ρύθμιση του pH του θρεπτικού μέσου της ζύμωσης ήταν 2,97 g/L.

### **3.2 Αξιολόγηση της επίδρασης του ρυθμού ανάδευσης ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης**

Οι συνθήκες της καλλιέργειας επηρεάζουν την μορφολογία της παραγόμενης κυτταρίνης. Υπό συνθήκες ανάδευσης σχηματίζονται ακανόνιστοι κόκκοι ενώ υπό στατικές συνθήκες σχηματίζεται η μεμβράνη της βακτηριακής κυτταρίνης (Κεφ. 1.1).

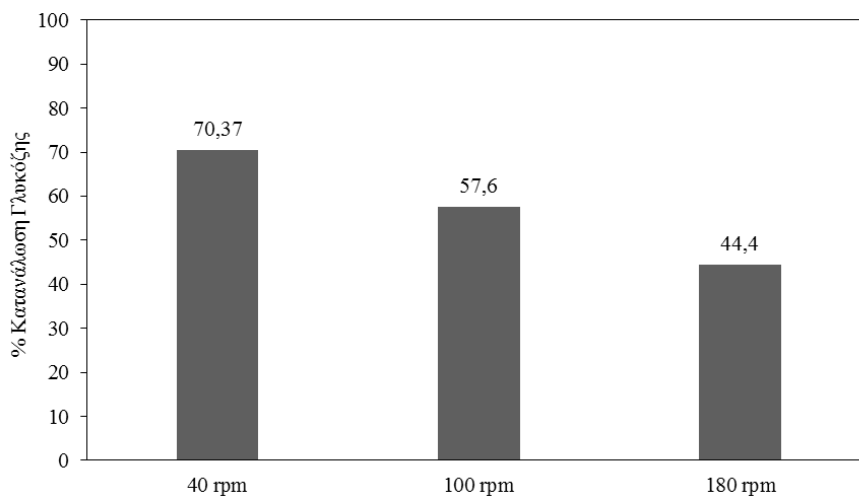
Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ότι μεγαλύτερη ποσότητα βακτηριακής κυτταρίνης μπορεί να παραχθεί υπό στατικές συνθήκες συγκριτικά με τις υπό ανάδευση συνθήκες. Οι στατικές συνθήκες απαιτούν μεγαλύτερη περιοχή και εργατική δύναμη καθιστώντας την βιομηχανική παραγωγή της κυτταρίνης πιο ακριβή. Ωστόσο, είναι δυνατόν, στις υπό ανάδευση συνθήκες βακτηριακά στελέχη θετικά στην παραγωγή της κυτταρίνης να μετατραπούν σε αρνητικά, μειώνοντας και πάλι την παραγωγικότητα (Kim et al., 2007). Για τον λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη της παραγωγής της σε διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης.

Στα πειράματα που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Hestrin-Schramm ως στάδιο εκκίνησης των ζυμώσεων ενώ οι ρυθμοί ανάδευσης που επιλέχτηκαν ήταν 40, 100 και 180 rpm. Η διάρκεια των ζυμώσεων ήταν 10 ημέρες.



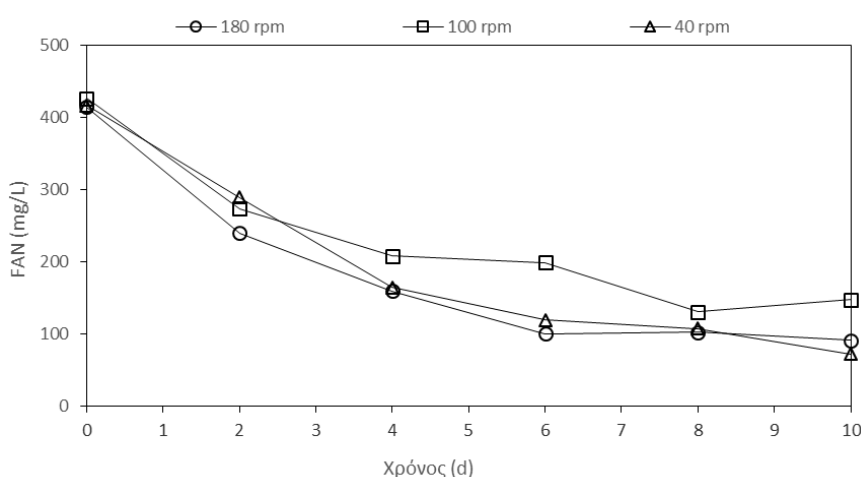
**Διάγραμμα 3.5** Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης μετά από 10 μέρες ζύμωσης σε 3 διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης 40, 100 και 180 rpm.

Το Διάγραμμα 3.5 δείχνει την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης σε διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης. Όπως παρατηρείται η μεγαλύτερη παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης επιτυγχάνεται στα 40 rpm όπου η τελική συγκέντρωσή της είναι 4 g/L. Στα 100 rpm, η συγκέντρωση της παραγόμενης κυτταρίνης είναι 2,6 g/L, ενώ στα 180 rpm είναι 2 g/L. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι και από τις τρεις αυτές ζυμώσεις η κυτταρίνη που παράχθηκε ήταν υπό τη μορφή μεμβράνης και όχι σφαιριδίων, όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά (Κεφ. 1.1).



**Διάγραμμα 3.6** Επί τοις εκατό κατανάλωσης γλυκόζης μετά από 10 μέρες ζύμωσης σε 3 διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης 40, 100 και 180 rpm.

Στο Διάγραμμα 3.6 παρουσιάζεται το επί τοις εκατό ποσοστό κατανάλωσης του υποστρώματος της γλυκόζης. Όπως παρατηρείται το ποσοστό αυτό μειώνεται καθώς αυξάνεται ο ρυθμός ανάδευσης. Το Διάγραμμα 3.7 δείχνει την κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και στις 3 μικροβιακές ζυμώσεις που διεξήχθησαν. Η μικρότερη κατανάλωση FAN παρατηρήθηκε στα 100 rpm με αντίστοιχη τιμή 269 mg FAN/L, ενώ στους άλλους δύο ρυθμούς ανάδευσης η κατανάλωση FAN κυμάνθηκε μεταξύ 326-344 mg FAN/L.



**Διάγραμμα 3.7** Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζυμώσεων σε 3 διαφορετικούς ρυθμούς ανάδευσης 40, 100 και 180 rpm.

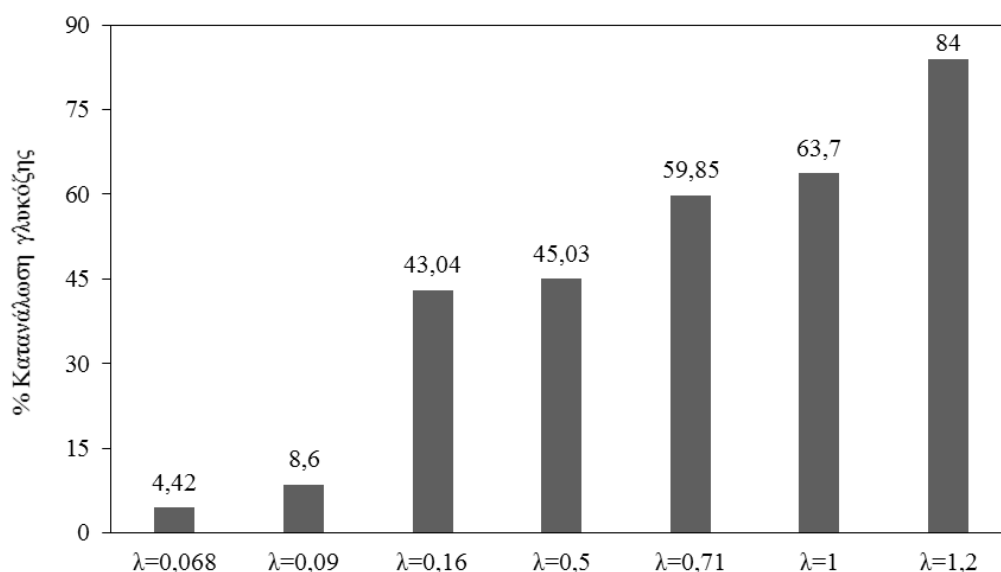
### 3.3 Αξιολόγηση της επίδρασης του λόγου επιφάνεια προς όγκο κατά την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης

Στις μέχρι τώρα έρευνες για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην επίδραση του λόγου επιφάνειας/όγκου ( $\lambda$ ) στην παραγωγή της. Οι Joris et al. (1990) συμπέραναν ότι σε τιμές του λόγου αυτού της τάξεως του  $2,2 \text{ cm}^{-1}$  παρουσιάστηκαν καλύτερα αποτελέσματα ως προς την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Από την άλλη, οι Masaoka et al. (1993) ανέλυσαν ένα εύρος τιμών  $0,13-1 \text{ cm}^{-1}$  και έδειξαν ότι η παραγωγή της κυτταρίνης καθοριζόταν από την επιφάνεια.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκαν 7 ζυμώσεις υπό στατικές συνθήκες με κοινή βάση το θρεπτικό υπόστρωμα HS και διάρκεια 14 ημερών οι οποίες όμως διέφεραν στον λόγο επιφάνειας/όγκου ( $\lambda$ ). Για την επίτευξη

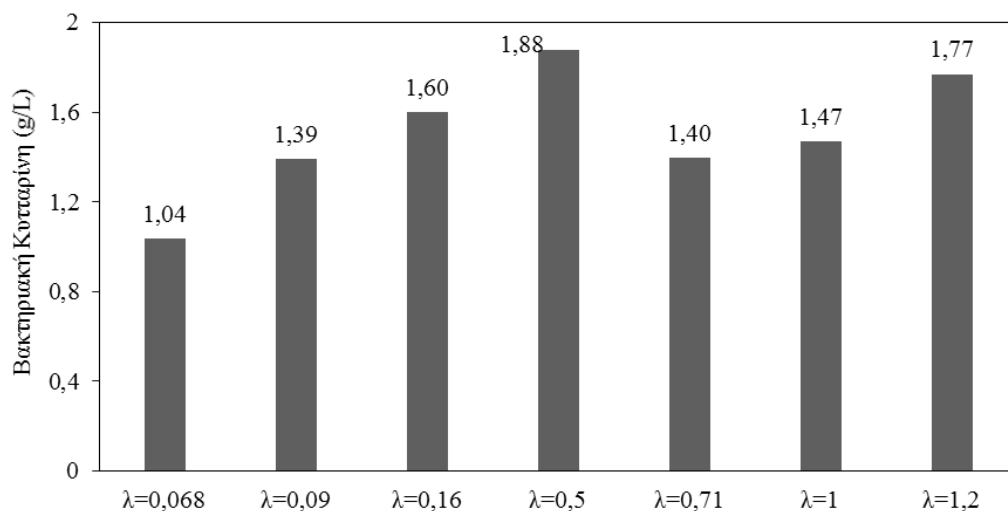
αυτού, μετρήθηκε αρχικά η επιφάνεια φιαλών Duran χωρητικότητας 1 L, η οποία βρέθηκε ότι είναι ίση με  $40,7 \text{ cm}^2$  και στην συνέχεια σε κάθε μία προστέθηκε διαφορετικός όγκος θρεπτικού μέσου ώστε στο τέλος να προκύψουν οι εξής λόγοι: 0,068, 0,09, 0,16, 0,5, 0,71, 1 και  $1,2 \text{ cm}^{-1}$ .

Στο τέλος των ζυμώσεων προσδιορίστηκε η κατανάλωση της γλυκόζης καθώς και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης (Διάγραμμα 3.8 και 3.9 αντίστοιχα).



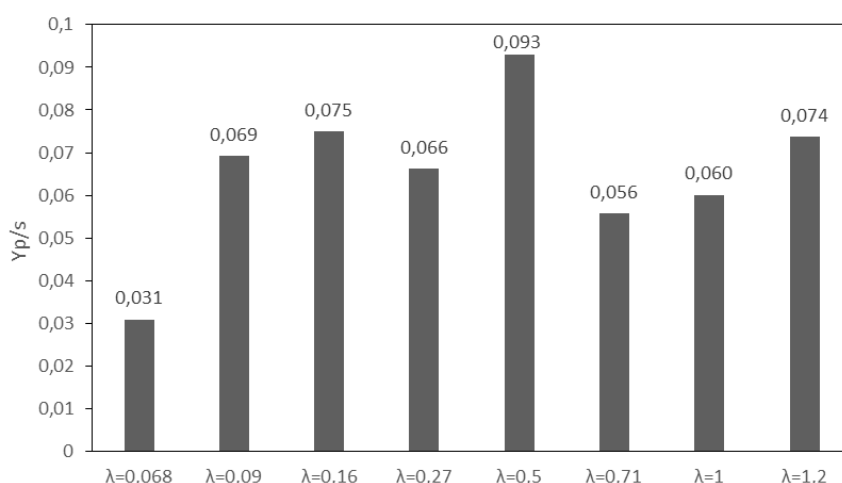
**Διάγραμμα 3.8** Κατανάλωση γλυκόζης σε ζυμώσεις διάρκειας 14 ημερών με διαφορετικό λόγο επιφάνειας/όγκου ( $\lambda$ ): 0,068; 0,09; 0,16; 0,5; 0,71; 1;  $1,2 \text{ cm}^{-1}$ .

Από το Διάγραμμα 3.8 παρατηρούμε ότι σε πολύ μικρές τιμές του  $\lambda$  η κατανάλωση της γλυκόζης είναι πολύ μικρή. Συγκεκριμένα για τον λόγο  $\lambda=0,068 \text{ cm}^{-1}$  το ποσοστό κατανάλωσης της γλυκόζης είναι 4,42 % ενώ την μεγαλύτερη κατανάλωση την έχουμε στον λόγο  $\lambda=1,2 \text{ cm}^{-1}$  η οποία είναι 84 %. Για τους λόγους 0,09; 0,16; 0,5; 0,71 και  $1 \text{ cm}^{-1}$  το ποσοστό κατανάλωσης της γλυκόζης είναι 8,6 %, 43,04 %, 45,03 %, 59,85 % και 63,7 % αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 3.9** Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε ζυμώσεις διάρκειας 14 ημερών με διαφορετικό λόγο επιφάνειας/όγκου ( $\lambda$ ): 0,068; 0,09; 0,16; 0,5; 0,71; 1; 1,2  $\text{cm}^{-1}$ .

Από το Διάγραμμα 3.9 παρατηρούμε ότι η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης δεν συμβαδίζει αναλογικά με την κατανάλωση της γλυκόζης. Η μεγαλύτερη παραγωγή προκύπτει στον λόγο  $\lambda=0,5 \text{ cm}^{-1}$ , η οποία είναι 1,88 g/L ενώ η μικρότερη εμφανίζεται στον λόγο  $\lambda=0,068 \text{ cm}^{-1}$  με τελική συγκέντρωση 1,04 g/L.



**Διάγραμμα 3.10** Συντελεστής απόδοσης προϊόντος σε ζυμώσεις με διαφορετικό λόγο επιφάνειας/όγκου ( $\lambda$ ) διάρκειας 14 ημερών.

Το Διάγραμμα 3.10 δείχνει τον συντελεστή απόδοσης κυτταρίνης στις ζυμώσεις με διαφορετικό λόγο επιφάνειας/ όγκου ( $\lambda$ ). Η απόδοση προϊόντος για τον λόγο  $\lambda=1,2$  είναι πάρα πολύ μικρή, της τάξεως του 0,074 g ανά g σακχάρου, ενώ για την ζύμωση αυτή η κατανάλωση της γλυκόζης ήταν 84%. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι εκτός από την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, και άλλες διεργασίες λαμβάνουν χώρα στο περιβάλλον της ζύμωσης, όπως η ανάπτυξη των κυττάρων. Σύμφωνα με τους Brown et al. (1976), οι δύο διεργασίες συμβαίνουν παράλληλα και ανταγωνίζονται για την πηγή άνθρακα στον *Glucanacetobacter xylinus*. Την μεγαλύτερη απόδοση την έχει ο λόγος  $\lambda=0,5 \text{ cm}^{-1}$ , η οποία είναι ίση με 0,09 g/g γλυκόζης.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ως αποτέλεσμα αυτής της σειράς πειραμάτων η μορφή της βακτηριακής κυτταρίνης που λάβαμε. Όταν ο λόγος επιφάνειας/ όγκου ήταν πολύ μικρός, δηλαδή όταν ο όγκος ήταν πολύ μεγάλος η βακτηριακή κυτταρίνη ήταν υπό την μορφή σφαιριδίων ενώ καθώς ο όγκος μειωνόταν, η βακτηριακή κυτταρίνη σχηματιζόταν υπό την μορφή μεμβρανών.

Στην Εικόνα 3.1 φαίνονται τα σφαιρίδια της βακτηριακής κυτταρίνης που παράγονται σε υπόστρωμα γλυκόζης και λόγο επιφάνειας/ όγκου  $\lambda=0,16 \text{ cm}^{-1}$  υπό στατικές συνθήκες. Η δημιουργία τους οφείλεται στον μεγάλο όγκο που χρησιμοποιήθηκε .



**Εικόνα 3.1** Σφαιρίδια βακτηριακής κυτταρίνης που σχηματίστηκαν κατά την διάρκεια ζύμωσης σε λόγο επιφάνειας/ όγκου  $\lambda=0,16 \text{ cm}^{-1}$ .

Στην Εικόνα 3.2 διακρίνεται η βακτηριακή κυτταρίνη που παράγεται σε ζύμωση με λόγο επιφάνειας/ όγκου  $\lambda=0,27 \text{ cm}^{-1}$ . Η ύπαρξη 3 μεμβρανών κυτταρίνης είναι εμφανής.





**Εικόνα 3.2** Μεμβράνες βακτηριακής κυτταρίνης που σχηματίζονται κατά την διάρκεια ζύμωσης σε λόγο επιφάνειας/ όγκου  $\lambda=0,27 \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.4 Αξιολόγηση της ποσότητας του εμβολίου ως προς την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης**

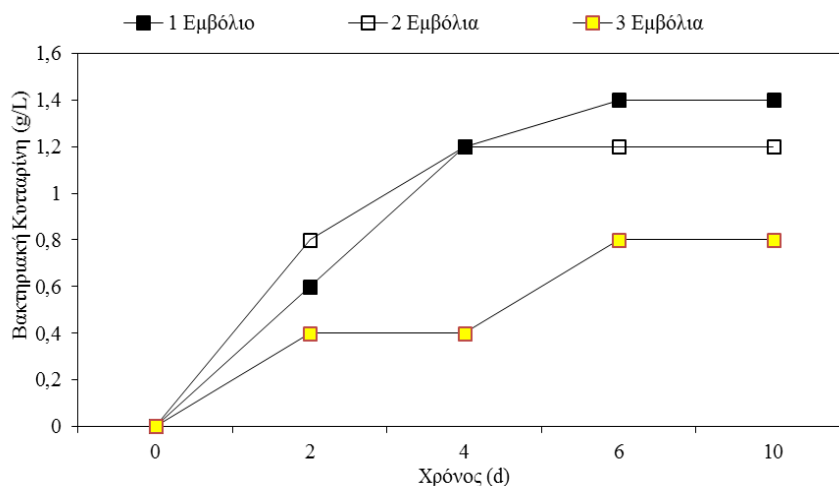
Σ' αυτή την σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της ποσότητας του εμβολίου ως προς την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης. Τα εμβόλια αναπτύχθηκαν για 3 μέρες σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα Hestrin- Schramm (HS-γλυκόζη) και εν συνεχεία εμβολιάστηκαν με προκαλλιέργεια 2 ημερών. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επιλέχθηκαν λόγω της μικρής τους διαμέτρου που βοηθά στον γρήγορο σχηματισμό μεμβρανών. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν το εμβόλιο των ζυμώσεων.



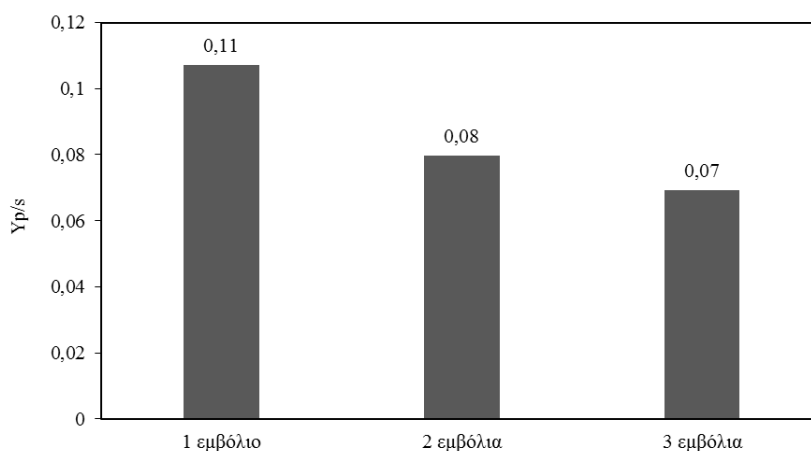
**Εικόνα 3.3** Εμβόλια με βακτηριακή κυτταρίνη που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 ζυμώσεις διάρκειας 10 ημερών η κάθε μια. Στην πρώτη ζύμωση οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν με μια μεμβράνη, προερχόμενη από τους δοκιμαστικούς σωλήνες, η δεύτερη ζύμωση με 2 μεμβράνες

και η τρίτη με 3. Το βάρος των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλια ήταν 0,01 g (επί ξηράς ουσίας), το οποίο αφαιρούνταν κάθε φορά από το βάρος του τελικού προϊόντος.



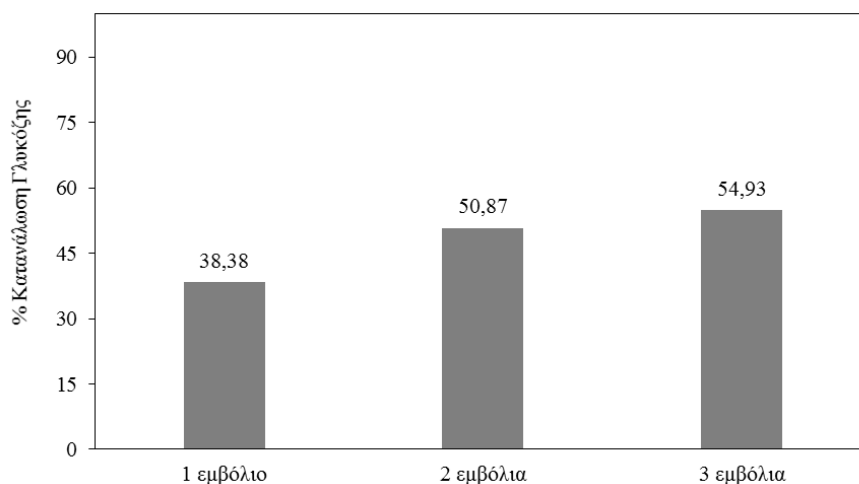
**Διάγραμμα 3.11** Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια ζυμώσεων με διαφορετική ποσότητα εμβολίου.



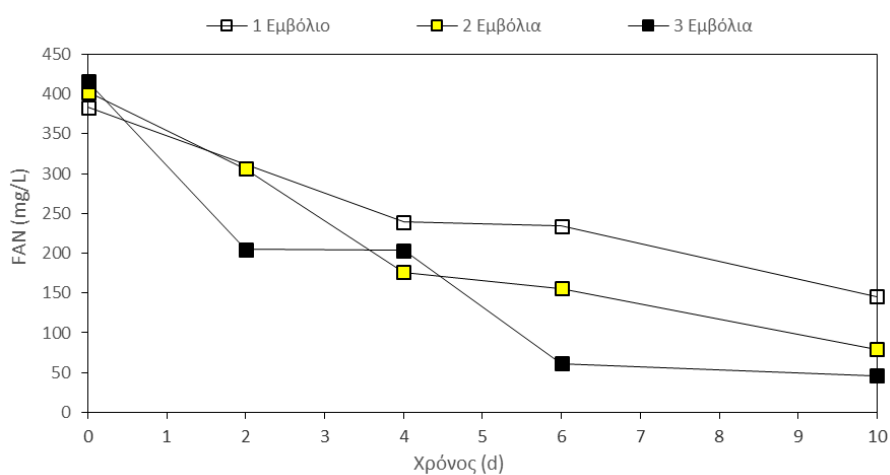
**Διάγραμμα 3.12** Συντελεστής απόδοσης βακτηριακής κυτταρίνης σε ζυμώσεις με διαφορετική ποσότητα εμβολίου.

Στο Διάγραμμα 3.11 παρουσιάζεται η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια των ζυμώσεων, ενώ στο Διάγραμμα 3.12 η απόδοση προϊόντος ως προς την πηγή άνθρακα. Όπως είναι φανερό και από τα δύο αυτά διαγράμματα μεγαλύτερη παραγωγή κυτταρίνης επιτεύχθηκε στην ζύμωση όπου χρησιμοποιήθηκε μια μεμβράνη ως εμβόλιο. Το Διάγραμμα 3.13 που ακολουθεί, δείχνει το επί τοις

εκατό (%) ποσοστό κατανάλωσης της γλυκόζης. Στο Διάγραμμα αυτό παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης (54,9 %) επιτεύχθηκε στη ζύμωση στην οποία χρησιμοποιήθηκαν 3 μεμβράνες ως εμβόλιο. Τέλος, το Διάγραμμα 3.14 απεικονίζει την κατανάλωση του FAN καθ' όλη την διάρκεια των τριών ζυμώσεων.



**Διάγραμμα 3.13** % Κατανάλωση γλυκόζης σε ζυμώσεις που χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα εμβολίου.



**Διάγραμμα 3.14** Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζυμώσεων που χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα εμβολίου.

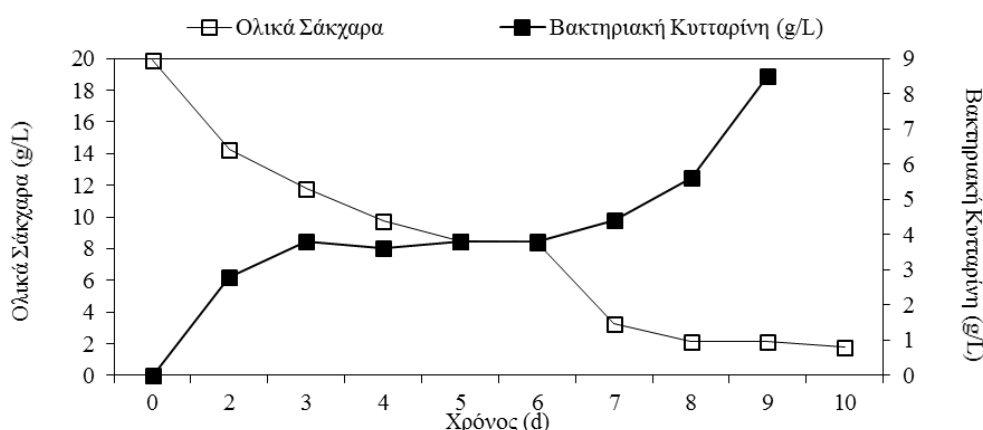
### 3.5 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-φρουκτόζης-σακχαρόζης

Σ' αυτό το πειραματικό στάδιο πραγματοποιήθηκε ζύμωση χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα συνδυασμό των σακχάρων γλυκόζη (67 %), σακχαρόζη (7 %) και φρουκτόζη (26 %), με σκοπό να γίνει μία προσομοίωση της σύστασης του χυμού του πορτοκαλιού. Ως βάση και σε αυτή την ζύμωση ήταν το θρεπτικό μέσο Hestrin-Schramm. Η συγκέντρωση των σακχάρων φαίνεται στον Πίνακα 3.1. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 10 ημέρες.

**Πίνακας 3.1** Συγκέντρωση των σακχάρων του υποστρώματος.

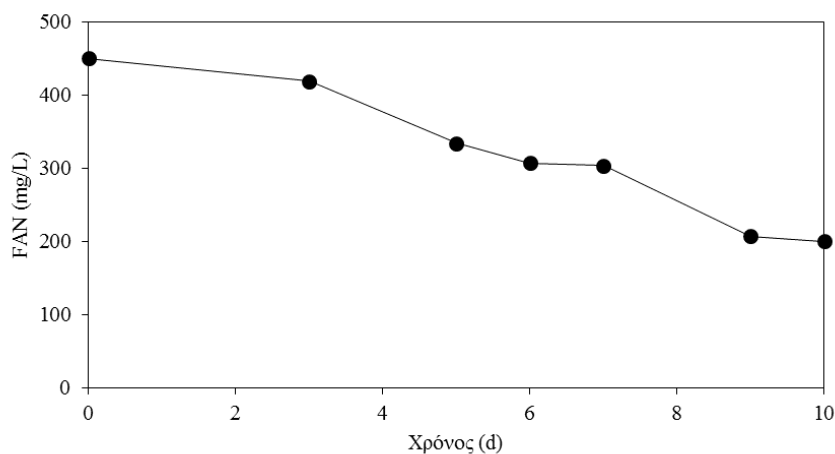
Σάκχαρα	Συγκέντρωση (g/L)
Γλυκόζη	13,4
Σακχαρόζη	1,4
Φρουκτόζη	5,2
Ολικά Σάκχαρα	20

Στο Διάγραμμα 3.15 παρουσιάζεται η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης και η κατανάλωση των ολικών σακχάρων συναρτήσει του χρόνου. Η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης ήταν αρκετά υψηλή από την δεύτερη μέρα. Η τελική συγκέντρωση ήταν 8,5 g/L, ενώ η απόδοση ήταν 0,45 g ανά g καταναλωθέντος σακχάρου.



**Διάγραμμα 3.15** Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και κατανάλωση υποστρώματος σε ζύμωση με θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-σακχαρόζης-φρουκτόζης.

Στο Διάγραμμα 3.16 παρουσιάζεται η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινοομάδων.



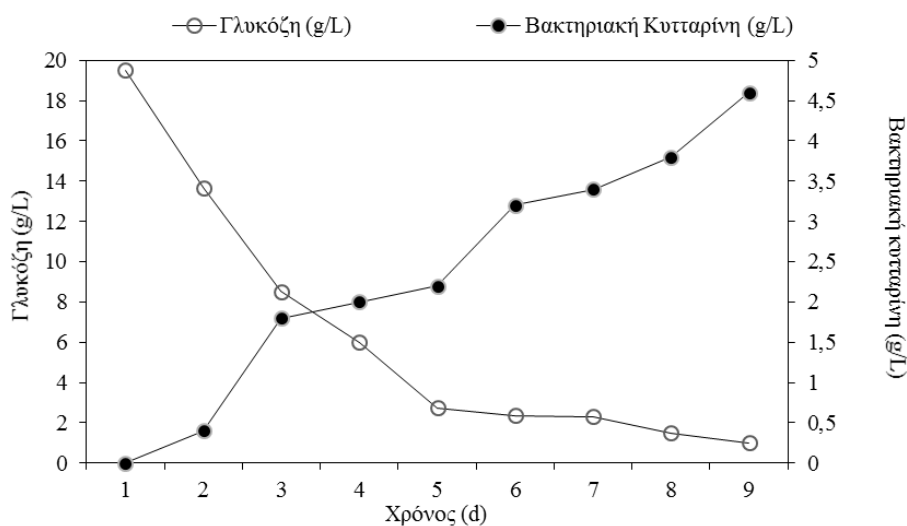
**Διάγραμμα 3.16** Κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινοομάδων κατά την διάρκεια ζύμωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-σακχαρόζης-φρουκτόζης.

## 3.6 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από ανανεώσιμες πρώτες ύλες

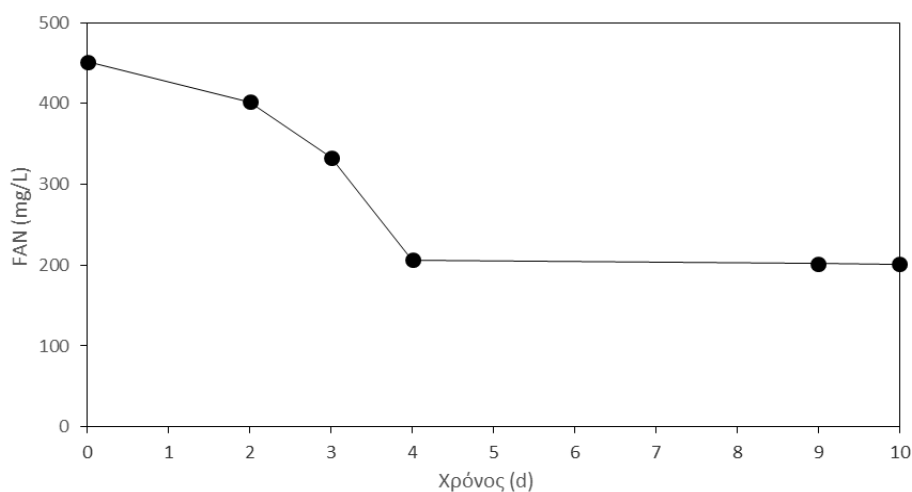
### 3.6.1 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από αμυλούχο υδρόλυμα προερχόμενο από στερεά απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων

Σε αυτό το πείραμα, το υδρόλυμα των στερεών αποβλήτων το οποίο προέρχεται από παιδικές τροφές που παράγονται από εταιρεία παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής, αξιοποιήθηκε για την ζύμωση προς παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Το συγκεκριμένο υδρόλυμα αποτελεί ένα πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο καλύπτει τις ανάγκες του μικροοργανισμού σε πηγές άνθρακα, αζώτου και ιχνοστοιχείων. Η σύσταση μετά την διαδικασία της υδρόλυσης ήταν 75 g/L γλυκόζης και 600 mg FAN/L υδρολύματος. Η αρχική σύσταση του θρεπτικού μέσου που προέκυψε μετά από αραίωση του υδρολύματος ήταν 19,5 g/L γλυκόζη και 451,5 mg FAN/L υδρολύματος. Η ζύμωση με το μικροβιακό στέλεχος *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 διήρκησε 10 μέρες.

Στο Διάγραμμα 3.17 απεικονίζεται η κατανάλωση της πηγής άνθρακα σε συνδυασμό με την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης έφτασε τα 4,6 g/L ενώ η απόδοση της παραγωγής ήταν 0,24 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Το επί τοις εκατό ποσοστό κατανάλωσης του σακχάρου μετά το πέρας της ζύμωσης ήταν 94,7%.



**Διάγραμμα 3.17** Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης κατά την διάρκεια ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο προέρχεται από υδρολυμένα στερεά απόβλητα.



**Διάγραμμα 3.18** Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο προέρχεται από υδρολυμένα στερεά απόβλητα.

### 3.6.2 Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από χυμό πορτοκαλιού

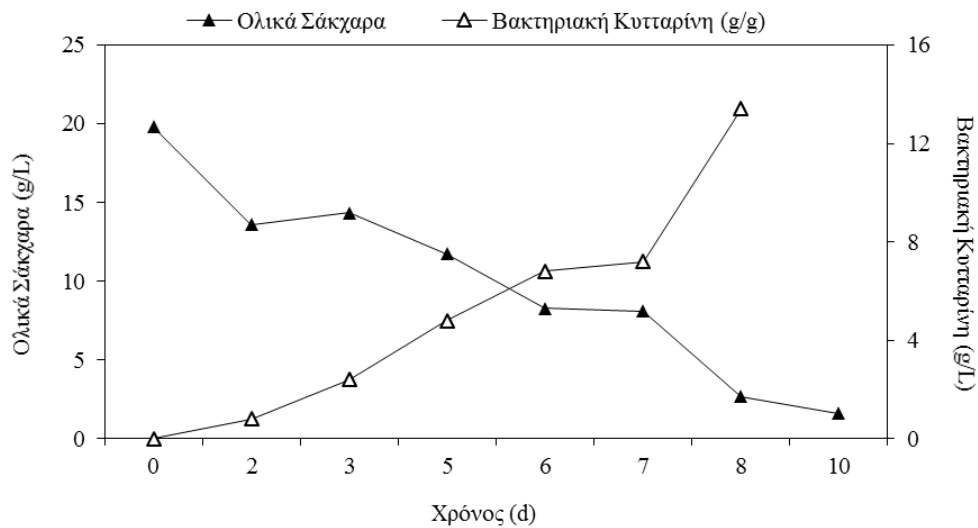
Μελέτες από τους Kurosuni et al. (2009) σε χυμούς φρούτων όπως το πορτοκάλι, ο ανανάς, το μήλο, το ιαπωνικό αχλάδι και τα σταφύλια έδειξαν ότι η μεγαλύτερη παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα χυμού πορτοκαλιού (5,9 g/L) και χυμού ανανά (4.1 g/L) έπειτα από 14 ημέρες ζύμωσης.

Η αρχική σύσταση του θρεπτικού μέσου σε σάκχαρα φαίνεται στον Πίνακα 3.2, η οποία μετά την αραίωση αντιπροσωπεύει και την αρχική συγκέντρωση των σακχάρων κατά την ζύμωση. Το pH του μέσου, το οποίο ήταν 3,5 ρυθμίστηκε στο 6 με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας 5M NaOH και η ζύμωση διήρκησε 10 ημέρες.

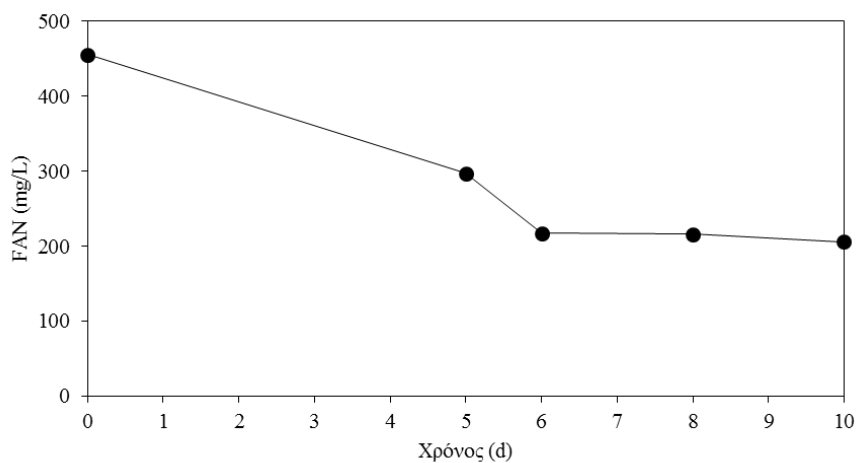
**Πίνακας 3.2** Ποσοτικοποίηση των σακχάρων του χυμού πορτοκαλιού.

Σάκχαρα	Συγκέντρωση (g/L) πριν την αραίωση	Συγκέντρωση (g/L) μετά την αραίωση
Σύνολο Σακχάρων	64,61	19,79

Στο Διάγραμμα 3.19 φαίνεται η παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης και η κατανάλωση της πηγής του άνθρακα κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Η παραγωγή της μετά το πέρας της ζύμωσης φτάνει τα 13,4 g/L. Το επί τοις εκατό ποσοστό κατανάλωσης των σακχάρων ήταν 93,7 % ενώ η απόδοση της βακτηριακής κυτταρίνης σ' αυτή την ζύμωση ήταν 0,71 g βακτηριακής κυτταρίνης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Η παραγωγή αυτή σε σχέση με αυτή που αναφέρεται βιβλιογραφικά είναι 2,3 φορές μεγαλύτερη.



**Διάγραμμα 3.19** Παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης και κατανάλωση των ολικών σακχάρων κατά την διάρκεια ζύμωσης με θρεπτικό μέσο χυμό πορτοκαλιού.



**Διάγραμμα 3.20** Κατανάλωση FAN κατά την διάρκεια ζύμωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα από χυμό πορτοκαλιού.



## 4. Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ερευνήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακής κυτταρίνης υπό διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία διέφεραν μεταξύ τους ως προς τον ρυθμό ανάδευσης, τον λόγο επιφάνειας προς όγκο ( $\lambda$ ) καθώς και την ποσότητα του εμβολίου. Επίσης αξιολογήθηκε η επίδραση του pH στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης.

Όλες οι ζυμώσεις διαλείποντος έργου έγιναν με το βακτηριακό στέλεχος *Komagateibacter sucrofermentans* DSM 15973, το οποίο είναι αρκετά αξιόλογο αφού μπόρεσε να μεταβολίσει ικανοποιητικά τα θρεπτικά υποστρώματα σε όλες τις συνθήκες καλλιέργειας που πραγματοποιήθηκαν.

Τα πειράματα με διαφορετικό ρυθμό ανάδευσης έδειξαν ότι ο μικρότερος από αυτούς είχε και την μεγαλύτερη απόδοση σε βακτηριακή κυτταρίνη.

Στα πειράματα με διαφορετικό λόγο επιφάνειας προς όγκο φάνηκε ότι ο λόγος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης. Συμπερασματικά, λόγοι μεταξύ του εύρους τιμών  $0,09-1 \text{ cm}^{-1}$  είχαν τις μεγαλύτερες αποδόσεις στον σχηματισμό μεμβράνης.

Η ποσότητα του εμβολίου είναι επίσης μείζονος σημασίας. Σύμφωνα με τα πειράματα, η ζύμωση με την μικρότερη ποσότητα είχε και την μεγαλύτερη απόδοση. Σημαντικό, επίσης, είναι η διατήρηση του pH στα βέλτιστα επίπεδα ώστε να στραφεί ο μεταβολισμός του βακτηριακού στελέχους προς την παραγωγή της βακτηριακής κυτταρίνης.

Τέλος, τα θρεπτικά υποστρώματα τα οποία προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και ανήκουν στην κατηγορία των βιομηχανικών αποβλήτων, υποπροϊόντων ή παραπροϊόντων μεταβολίστηκαν ικανοποιητικά από τον μικροοργανισμό και έδωσαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μικροβιακής κυτταρίνης σε σχέση με τα εμπορικά σάκχαρα.

Περαιτέρω έρευνα στην γενετική (μεταλλαγμένα ή ανασυνδυασμένα στελέχη) και μεταβολική βάση της σύνθεσης της βακτηριακής κυτταρίνης είναι απαραίτητη για την επίτευξη μιας οικονομικής παραγωγικής διαδικασίας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί η αναγκαιότητα εφαρμογής τεχνικών συντήρησης του μικροοργανισμού, οι οποίες να εξασφαλίζουν την επαναληψιμότητα της διεργασίας παραγωγής βακτηριακής κυτταρίνης και την μείωση του χρόνου προετοιμασίας. Επίσης αυτές οι

τεχνικές θα πρέπει να παρέχουν υψηλά ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων ενώ δεν θα πρέπει να επηρεάζουν τον σχηματισμό της κυτταρίνης.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια ακόμα σημαντική απόδειξη της δυνατότητας ανάπτυξης και εφαρμογής της αειφόρου τεχνολογίας. Η χρήση των αγροτικών και βιομηχανικών παραπροϊόντων ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αλματώδους αύξησης όλων των τομέων παραγωγής που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των αποβλήτων δημιουργώντας δυσεπίλυτο πρόβλημα στις βιομηχανίες (Peters, 2007). Το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από το ζήτημα της βιομετατροπής τους παραμένει αναλλοίωτο, παρά τον μεγάλο αριθμό ερευνών που έχουν γίνει ως τώρα για την αξιοποίησή τους

## 5. Βιβλιογραφία

Brett C.T.: Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall, *Intl. Rev. Cytol.* 199: 161-199, (2000).

Brown A.J.: On an acetic ferment which forms cellulose, *J.Chem Soc.* 49, 432-439 (1886).

Brown R.M., Willison, JHM., Richardson, C.L.: Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73(12), 4565-9, (1976).

Chawla Prashant R., Ishwar B. Bajaj, Shrikant A. Survase and Rekha S. Singhal: Microbial Cellulose: Fermentative Production and Application: Food Technol. *Biotechnol.* 47 (2), 107-124, (2009).

Cleenwerck I., De Vos P., De Vuyst : Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *Sucrofermentans* as *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Toyosaki et al. 1996) sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60 (10), 2277-83 (2010).

Colvin J.R.: Formation of cellulose microfibrils in a homogenate of *Acetobacter xylinum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70,294-295 (1957).

Costeron JW: The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 22(4-5), 551-563, (1999).

Czaja W., Romanovicz D., Brown M.R : Structural investigation of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture: *Cellulose II* 403-411 (2004).

Fernandes SCM., Oliveira L., Freire CSR., Silvestre AJD., Pascoal Neto C., Gandini A.: Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chem.* 11 (12), 2023-9, (2009).

Fiedler S., Fussel M., Sattler K., *Zentralbl. Microbiol.*144, 473, (1989).

Huber Tim, Jorg Mussig, Owen Curnow, Shusheng Pang, Simon Bickerton, Mark P. Staiger : A critical review of all- cellulose composites J Mater Sci. 47, 1171-1186, (2012).

Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A. Bacterial cellulose: a masterpiece of nature's arts. J Mater Sci. 35 (2), 261-70, (2000).

Ishikawa A., Masuoka M., Tsuchida T., Yoshinaga F. Biosci. Biotech. Biochem., 59, 2259 (1995).

Jonas R., Farab L.F.: Production and application of microbial cellulose. Polym. Degrad. Stabil. 59, 101-106, (1998).

Johnson D.C and A.M Neogi, US Patent, No.4863565 (1989).

Joris K., Billiret F., Drieghe S., Brackx D., Van- damme E. Med. Fat. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 5514, 1563 (1990).

Keshk SMAS, Razek TMA, Sameshima K.: Bacterial Cellulose production from beet molasses. Afr J Biotechnol. 5 (17), 1519-23, (2006).

Kim J.Y., Kim J.N., Wee Y.J., Park D.H., Ryu H.W.: Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter sp. RKY5 in a rotary biofilm contactor. Appl. Biochem. Biotechnol. 137,529–537, (2007).

Klemm D, Kramer F., Moritz S., Lindstr\_m T., l Ankerfors M., Gray D., Dorris A.: Nanocellulose: A New Family of Nature-Based Materials Angew. Chem. Int. Ed. 50, 5438-5466, (2011).

Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S.: Bacterial synthesized cellulose: artificial blood vessels for microsurgery. Prog Polym. Sci. 26 (9), 1561-603, (2001).

Koutinas, A., Belafi-Bako, K., Kabiri-Badr, A., Toth, A., Gubicza, L., Webb, C.: Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides: Hydrolysis of Starch by an Enzyme Complex from Fermentation by Aspergillus awamori. Food and Bioproducts Processing. 79, 41-45, (2001).

Kurosumi A.S., Yamashita C., Nakamura Y.: Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydr. Polym.* 76(2), 333-5, (2009).

Lie S.: The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing.* 79, 37-41, (1973).

Masaoka Satoshi, Tatsuhiko ohe and Naokazu Sakota : Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*, *Journal of fermentation and bioengineering* Vol. 75(1), 18-22 (1993).

Matsuoka M., Tsuchida T., Matsushita K., Adachi O., Yoshinaga F.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60,575 (1996).

Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31, pp. 426–428, (1959).

Naritomi T., Kouda T., Yano H., Yoshinaga F.: Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture, *J. Ferment. Bioeng.* 85, 89-95, (1998).

Noro N., Sugano Y., Shoda M.: Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 199–205, (2004).

Oikawa T., Morino T., Ameyanea, M.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1564 (1995).

Oikawa T., Ohtori T., Ameyanea M.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 331, (1995).

Peters D.: Raw materials. *Advanced Biochemistry Engineering and Biotechnology* 105, pp. 1-30, (2007).

Ring D., Nasheed W., Dow T.: Liquid loaded pad for medical applications. US Patent 4588400, (1986).

Ross P, Mayer R, Benziman M.: Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 55 (1), 35-58, (1991).

Ruka Dianne R., George P. Simon, Katherine M. Deana: Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose, *Carbohydrate Polymers*. 89, 613-622, (2012).

Schmauder H.-P., Geyer U., Einfeldt L., Klemm D., Marsch S.: *Med. Far. Landbouww. Univ. Gent*, 59/4b, 24 11, (1994).

Schramm M., Hestrin S.: Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* 11, 123-129, (1954).

Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Beppu T., Horinouchi S.: Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1377–1379, (1996).

Valla S., Coucheron D. H., Fjaervik E., Kjosbakken J., Weinhouse H., Ross P., Amikam D., Benziman M.: Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose- negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene, *Mol. Gen.Genet.* 217, 26-30, (1989).

Vandamme E.J., De Baets S., Vanbaelen A., Joris K., De Wulf P.: Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym. Degrad. and Stab.* 59, 93-99, (1998).

Yamada Y., Hoshino K., Ishikawa T.: Validation list no. 64. : Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 327-328, (1998).

Yamada Yuzo, Pattaraporn Yukphan, Huong Thi Lan Vu, Yuki Muramatsu, Duangjai Ochaikul, Somboon Tanasupawat, Yasuyoshi Nakagawa : Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of a new combination (*Acetobacteraceae*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58, 397-404, (2012).

Yang Y.K., Park S.H., Hwang J.W., Pyun Y.R., Kim Y.S.: Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition, *J. Ferment. Bioeng.* 85, 312–317, (1998).

Yoshinaga F., Tonouchi N., Watanabe K.: Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its applications as a new industrial material. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61(2): 219-224 (1997).

Watanabe K., Tabuchi M., Morinaga Y., Yoshinaga F.: Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture, *Cellulose*. 5, 187-200, (1998).

Wiegand C., Klemm D.: Influence of protective agents for preservation of *Gluconacetobacter xylinus* on its cellulose production, *Cellulose*, 13, 485–492, (2006)

Weinhouse H., Benziman M.: *Biochemical Journal*, 138, 537–542, (1974).